

**Untersuchung elektrochemisch aktiver Biofilme  
von *Geobacter Sulfurreducens* mit der  
Schwingquarz-Mikrowaage**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Philipp Sievers**

aus Goslar

genehmigt von der

Fakultät für Natur- und Materialwissenschaften  
der Technischen Universität Clausthal

Tag der mündlichen Prüfung

14. Februar 2020

Dekan

Prof. Dr.-Ing. Karl-Heinz Spitzer

Vorsitzende/r der Promotionskommission

Prof. Dr. Arnold Adam

Betreuer

Prof. Dr. Diethelm Johannsmann

Gutachter

apl. Prof. Dr.-Ing. Ulrich Kunz

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2016 bis November 2019 im Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität Clausthal im Arbeitskreis von Prof. Dr. Diethelm Johannsmann angefertigt.

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich bei Prof. Dr. Diethelm Johannsmann für die Überlassung des sehr interessanten Themas, der Aufnahme in Arbeitsgruppe und der guten Betreuung während der Dissertation bedanken.

Prof. Dr.-Ing. Ulrich Kunz danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Arne Langhoff für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, der technischen Hilfe bei meinen Versuchsaufbauten und fürs Korrekturlesen des Manuskripts der Arbeit.

Bei Michael Tölle möchte ich mich für die unkomplizierten Beschaffungen von Chemikalien und Laborausrüstung bedanken.

Bei Andreas Böttcher möchte ich mich für sein handwerkliches Geschick und der Geduld bei der Konstruktion der Messaufbauten und für die gelegentliche handwerkliche Hilfe bedanken.

Bei Astrid Peschel und Judith Petri möchte ich mich für die Hilfe bedanken, dass sie mir mit ihrer Erfahrung bei der Arbeit mit Schwingquarzen bei Fragen geholfen haben.

Mein Dank gilt auch der kompletten ElektroBak Forschergruppe für die hilfreichen Diskussionen bei den vielen Projekttreffen. Im speziellen möchte ich hier noch Christopher Moß und Igor Schmidt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Schröder danken für die Hilfe bei der Anzucht der elektrochemisch aktiven Biofilme.

Bei Dipl. Ing. Dennis Haupt möchte ich für die Hilfe mit dem Graphit-Lack bei der Beschichtung des Torsions-Resonators danken.

Bei Dr. Ing. Berthold Bode und der Firma flucon möchte ich mich für die regelmäßige und unkomplizierte Neubeschichtung der Torsions-Resonatoren bedanken.

Für die Unterstützung meiner Forschung im Rahmen von Bachelorarbeiten und Seminarversuchen möchte ich mich bei Kuangjie Liu, Rostislav Federov, Manuel Gross, Samuel Menacher und Niklas Huse bedanken.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die schönen Kaffeepausen und die vielen leckeren Kuchen möchte ich mich bei Dr. Heike Römermann, Christian Leppin, Nicole Panzier, Frederick Meyer, Alena Wittkowski und allen weiteren Angehörigen der PC, die bisher ungenannt geblieben sind, bedanken.

Für das Korrekturlesen der Arbeit und für die Hilfe bei Programmierungsfragen möchte ich meinem Bruder Fabian Jütte danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern Ursula Sievers und Volker Sievers bedanken, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung .....	1
2 Hintergrund .....	3
2.1 Biofilme.....	3
2.1.1 Bioelektrische Systeme .....	4
2.1.2 Biofilmaufbau.....	5
2.1.3 Biofilmwachstum .....	6
2.1.4 Elektrochemisch aktive Biofilme .....	7
2.2 Das Bakterium <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	10
2.2.1 Acetatstoffwechsel .....	10
2.2.2 Atmungskette und äußere Cytochrome .....	12
3 Theorie .....	15
3.1 Impedanzspektroskopie .....	15
3.1.1 Allgemeines.....	15
3.1.2 Constant Phase Element .....	16
3.2 Schwingquarz-Mikrowaage .....	17
3.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip .....	17
3.2.2 Datenaufnahme mittels Impedanzspektroskopie.....	19
3.2.3 Small-Load-Approximation .....	20
3.2.4 Sauerbrey Fall .....	21
3.2.5 Kanazawa-Gordon-Fall .....	22
3.2.6 Viskoelastische Medien.....	22
3.2.7 Akustischer-Multilayer-Formalismus .....	23
3.2.8 Filmresonanz .....	25
3.2.9 Dämpfender Kontakt .....	26
3.3 Torsions-Resonatoren.....	27
3.3.1 Flächenabhängigkeit.....	29
3.3.2 Piezoelektrische Versteifung.....	30

3.4	Elektrochemie.....	31
3.4.1	Elektrodenpotential und Nernst Gleichung .....	31
3.4.2	Buttler-Volmer-Gleichung .....	33
3.4.3	Faraday Effizienz .....	34
3.4.4	Strom Effizienz .....	34
4	Experimentelles.....	35
4.1	Anzucht elektrochemisch aktiver Biofilme.....	35
4.2	Verwendete Schwingquarze .....	36
4.2.1	Torsions-Resonatoren.....	36
4.2.2	Dicken-Scher-Resonatoren.....	37
4.3	Datenaufnahme und Auswertung .....	38
4.3.1	Datenerfassung .....	38
4.3.2	Datenauswertung mittels QTM .....	39
4.4	Herstellung des Graphit-Lacks .....	40
4.5	Herstellung des Inokulums .....	41
4.6	Herstellung der Nährlösung .....	41
4.6.1	Herstellung des Phosphatpuffers .....	42
4.6.2	Herstellung der Mineralien-Stammlösung .....	42
4.6.3	Herstellung der Vitamin-Stammlösung.....	42
5	Ergebnisse und Auswertung.....	43
5.1	Vorversuche .....	43
5.1.1	Flächenabhängigkeit und Auswertung mit Kanazawa-Gordon-Relation.....	43
5.1.2	Sauerbrey und Filmresonanz .....	44
5.1.3	Piezoelektrische Versteifung.....	45
5.2	Biofilmwachstum auf Quarzresonatoren mit Acetat.....	46
5.2.1	Wachstum eines Biofilms auf einem Dicken-Scher-Resonator .....	47
5.2.2	Biofilmwachstum auf einem Torsions-Resonator.....	49
5.3	Biofilmwachstum mit variablen Wachstumsbedingungen.....	53

5.3.1	Wachstum mit Glycerin auf Torsions-Resonatoren .....	53
5.3.2	Wachstum mit Glycerin auf Dicken-Scher-Resonatoren .....	57
5.3.3	Wachstum ohne Vitamin- und Mineralien-Lösung.....	58
5.3.4	Wachstum bei verschiedenen Potentialen .....	60
5.4	Weitere Parameter Abhängigkeiten .....	64
5.4.1	Einfluss der Acetatkonzentration auf die Stromproduktion .....	65
5.4.2	Einfluss der Temperatur .....	66
5.4.3	Optimale Biofilmdicke .....	68
5.4.4	Steifigkeit .....	68
5.4.5	Maximale Bandbreitenverschiebung und Pilieffizienz .....	69
5.5	Biofilmreaktion auf äußere Stressfaktoren.....	70
5.5.1	Biofilmwachstum mit Acetatmangel.....	71
5.5.2	Biofilmwachstum mit variablen Potentialen .....	77
5.5.3	Biofilmreaktion auf ein freies Potential .....	81
5.5.4	Wirkung des Bakterizids Chloramin B .....	82
5.5.5	Zugabe von Antibiotika und Quecksilber .....	85
5.6	Cyclovoltammetrie an Biofilmen auf Schwingquarzen .....	86
5.6.1	Cyclovoltammetrie mit Torsions-Resonatoren .....	86
5.6.2	Cyclovoltammetrie mit Dicken-Scher-Resonatoren .....	88
5.7	Elektrochemische Impedanz Spektroskopie.....	89
5.7.1	EIS an einem Biofilm auf einem Torsions-Resonator .....	90
5.7.2	EIS an einem Biofilm auf einem Dicken-Scher-Resonator .....	93
6	Zusammenfassung.....	97
7	Ausblick .....	101
8	Literaturverzeichnis.....	103
9	Anhang .....	109
9.1	Liste der verwendeten Chemikalien .....	109
9.2	Liste der verwendeten Symbole und Konstanten .....	113

9.3	Abkürzungsverzeichnis .....	117
9.4	Übersicht über alle Messungen .....	118
9.5	Liste der Veröffentlichungen und Präsentationen .....	120



# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung von Biofilmen mit der Schwingquarz-Mikrowaage. Biofilme sind auf der Erde allgegenwärtig, weil ein Großteil aller auf der Erde lebenden Mikroorganismen in Biofilmen lebt.<sup>[1]</sup> Trotzdem ist unser Wissen in Bezug auf den Aufbau und das Verhalten von Biofilmen begrenzt. Ein wesentliches Problem der Biofilmforschung ist die große Variabilität von Biofilmen. Durch ihre Vielfältigkeit ist es schwierig, allgemeingültige Aussagen über Biofilme zu treffen.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung von elektrochemisch aktiven Biofilmen von *Geobacter sulfurreducens*. Diese Biofilme wachsen auf Elektronenakzeptoren auf und nutzen diese für ihren Metabolismus. Daher ist es mit solchen Biofilmen möglich, aus der Zersetzung organischer Komponenten in Abwasser oder Sedimenten elektrischen Strom zu gewinnen.<sup>[2]</sup> Ein solches System wird als Mikrobielle Brennstoffzelle bezeichnet. Ein wesentliches Problem, welches der technischen Anwendung solcher Systeme entgegensteht, ist die geringe Leistungsdichte. Zur Optimierung ist eine Onlineüberwachung der Dicke und der mechanischen Eigenschaften des Biofilms sinnvoll. Etablierte Methoden wie etwa CLSM zur Dickenbestimmung oder rheologische Untersuchungen mit einem Rheometer haben jedoch das Problem, dass einerseits der Biofilm durch die Messung verändert wird oder dass andererseits die Messtechnik nur schlecht auf Biofilme anwendbar ist.<sup>[3,4]</sup>

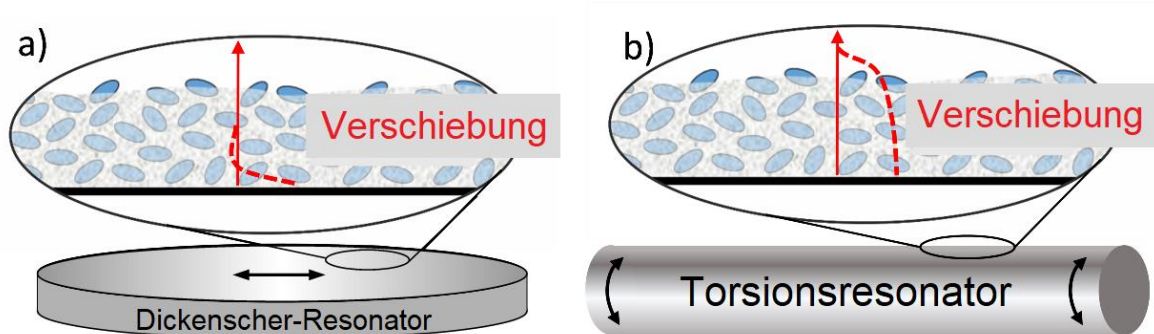


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Scherwelle in einem Biofilm auf einem Torsions-Resonator und auf einem Dicken-Scher-Resonator.

Diese Probleme können durch die Verwendung einer Schwingquarz-Mikrowaage gelöst werden. Diese ermöglicht eine nicht invasive Messung während des gesamten Biofilmlebenszyklus.<sup>[5,6]</sup> Der Quarzresonator liefert Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften des Biofilms. Auch die Biofilmdicke ist zugänglich, wenn die Scherwelle des Resonators die Oberkante des Biofilms erreicht. Für Standard Dicken-Scher-Resonatoren (Abbildung 1 a) ist

## 1. Einleitung und Zielsetzung

dies allerdings schwierig, weil deren Eindringtiefe in einen Biofilm mit wenigen hundert Nanometern zu klein ist. Daher wird in dieser Arbeit zusätzlich auf Torsions-Resonatoren zurückgegriffen.<sup>[7]</sup> Deren Resonanzfrequenz ist kleiner. Dementsprechend steigt die Eindringtiefe der Scherwelle an, sodass auch dickere Biofilme untersucht werden können (Abbildung 1 b).

Zunächst wird in Kap. 2 auf den Aufbau und das Wachstum von Biofilmen eingegangen. Danach wird der Aufbau elektrochemisch aktive Biofilme erörtert und das biofilmbildende Bakterium *Geobacter sulfurreducens* vorgestellt.

In Kap. 3 folgt der theoretische Hintergrund der verwendeten Mess- und Auswertmethoden. Diese Kapitel gliedert sich in einen Abschnitt über die Impedanzspektroskopie, die sowohl bei der Schwingquarz-Mikrowaage als auch bei der Charakterisierung elektrochemischer Systeme Anwendung findet. Der nächste Abschnitt befasst sich mit der allgemeinen Theorie hinter der Schwingquarz-Mikrowaage, gefolgt von einem Abschnitt über die besonderen Eigenschaften von Torsions-Resonatoren.

Kap. 4 beschreibt das experimentelle Vorgehen beim Züchten von elektrochemisch aktiven Biofilmen auf Schwingquarz-Resonatoren. Der Ergebnisteil in Kap. 5 beginnt mit Vorversuchen zum Torsions-Resonator, bei denen der Sauerbrey-Fall, der Kanazawa-Gordon-Fall und die Flächenabhängigkeit überprüft werden (Kap. 5.1).

Die Kap. 5.2–Kap. 5.4 konzentrieren sich auf die Untersuchung des Biofilmwachstums unter unterschiedlichen Bedingungen wie der Temperatur, der Kohlenstoffquelle (Glycerin, Acetat), dem Potential der Arbeitselektrode und der Zusammensetzung des Nährmedium. Aus einem viskoelastischen Modell werden die Dicke und die Steifheit als Parameter abgeleitet und mit den Stromdaten des Potentiostaten korreliert.

Kap. 5.5 diskutiert die Reaktion der Biofilme auf Stress wie Acetatmangel, ungünstige Potentiale und Bakterizide.

In Kap. 5.6 und Kap. 5.7 wird die Schwingquarz-Mikrowaage mit der mit den elektrischen Messmethoden der Cyclovoltammetrie und der Elektrochemischen Impedanz Spektroskopie gekoppelt.

## 2 Hintergrund

### 2.1 Biofilme

Als Biofilme werden gelartige Strukturen bezeichnet, die durch Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen, Mikroalgen und Pilze) gebildet werden und oft an Grenzflächen zu finden sind.<sup>[1]</sup> Sie gehören zu den am weitesten verbreiteten Formen von organisiertem Leben. Die ältesten Spuren von Biofilmen sind 3.5 Milliarden Jahre alt und stammen aus Australien.<sup>[8]</sup> Die erste Beschreibung eines Biofilmes erfolgte im Jahr 1676 durch Antonie van Leeuwenhoek, als er seinen Zahnplaque – einen Biofilm – untersuchte.<sup>[9]</sup> Trotzdem dauerte es noch bis ins späte 20. Jahrhundert, bis die weitreichende Bedeutung und Komplexität von Biofilmen erkannt wurde.<sup>[10]</sup>

Die Organisation in Form von Biofilmen hat für Bakterien wichtige Vorteile. Sie können Bakterien an eine Oberfläche binden, sodass sie nicht weggeschwemmt werden. Außerdem dienen Biofilme als Speicher für Nährstoffe und Wasser. Durch die Artenvielfalt in Biofilmen kommt es zu Synergieeffekten zwischen den unterschiedlichen Zellen. Es bilden sich Gebiete mit variablen Bedingungen aus (z.B. aerob und anaerob), in denen Organismen leben können, die an diese Bedingungen angepasst sind. Nicht zuletzt haben Biofilme auch eine Schutzfunktion gegen Schwermetalle und Antibiotika.<sup>[11]</sup>

Aufgrund dieser Vorteile sind Biofilme auch die am weitesten verbreitete Form von mikrobiellem Leben. Sie finden sich überall dort, wo mikrobielles Leben möglich ist. Es muss lediglich Feuchtigkeit und ein gewisses Nährstoffangebot vorhanden sein. Dementsprechend wachsen Biofilme auf Steinen, an Sedimenten, in Thermalquellen, an (Ab-)Wasser Leitungen und Schiffen oder auch in oder an menschlichem oder tierischem Gewebe.<sup>[12]</sup> Sie haben einen wesentlichen Anteil an den globalen Stoffkreisläufen.

Auch die wirtschaftliche Bedeutung von Biofilmen ist groß. So kommt es in der Öl- und Gasindustrie und in Wasseraufbereitungsanlagen jedes Jahr zu Schäden in Milliardenhöhe, die durch Biofilme in Form von Biofouling verursacht werden.<sup>[13,14]</sup> Andererseits gibt es auch nützliche Formen von Biofilmen. So finden Sie Anwendung in der Abwasserbehandlung oder auch in der Immobilisierung von Schwermetallen.<sup>[15,16]</sup> In Bioelektrischen Systemen (BES) dienen Biofilme als Redoxkatalysatoren für die Koppelung zwischen Strom und chemischen Reaktionen.

## 2. Hintergrund

### 2.1.1 Bioelektrische Systeme

Bioelektrische Systeme sind hybride Systeme bestehend aus einem biologischen und einem elektrochemischen Anteil. Der elektrochemische Teil besteht aus einem Elektrodenaufbau in einer Lösung, ggf. in zwei Teile geteilt durch eine semipermeable Membran. Der biologische Teil besteht aus Mikroorganismen, die die Elektrode(n) bewachsen und als Katalysatoren wirken. So können die Vorteile eines biologischen Systems, Selbstreproduzierbarkeit und hohe Substratspezifität, mit den Vorteilen elektrochemischer Systeme, gute Kontrollierbarkeit des Stromes und hohe Coulomb-Effizienz, kombiniert werden.

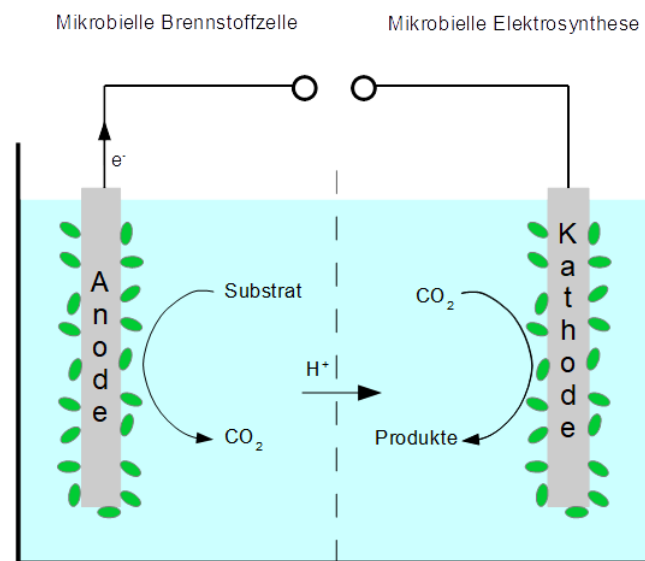


Abbildung 2: Einsatz elektrochemisch aktiver Biofilme entweder als anodische Biofilme (Mikrobielle Brennstoffzelle) oder kathodische Biofilme (Mikrobielle Elektrosynthese).

Grundsätzlich gibt es zwei Arten von bioelektrischen Systemen. Die einen produzieren Strom, die anderen verbrauchen Strom. Zu den stromproduzierenden Systemen gehört die Mikrobielle Brennstoffzelle (microbial fuel cell, MFC). Sie ist die älteste Form eines BES.<sup>[17]</sup> In einer MFC werden Biofilme in der Regel an der Anode eingesetzt.<sup>[18]</sup> Mit ihrer Hilfe können elektrochemisch inaktive Verbindungen zersetzt und so der direkten Verstromung zugänglich gemacht werden. Die Kathodenreaktion ist in der Regel abiotisch (z.B. Sauerstoffreduktion).<sup>[19]</sup>

Zu den stromverbrauchenden BES gehören die Mikrobielle Elektrolysezelle (microbial electrolysis cell, MEC) und die Mikrobielle Synthesezelle (microbial electrosynthesis cell, MSC). Die MEC dient in der Regel der Wasserstoffproduktion unter Einsatz anodischer Biofilme. In diesem Fall muss elektrische Energie in das System eingebracht werden, um das Anodenpotential zu modifizieren. Allerdings wird durch den elektrochemisch aktiven Biofilm die Wasserstoffproduktion an den Abbau der Substrate gekoppelt, wodurch der Bedarf an elektrischer Energie gesenkt wird.<sup>[20]</sup>

Im Gegensatz dazu dient die MSC der Synthese komplexerer organischer Stoffe. Hierfür werden häufig kathodische Biofilme verwendet. Die Biofilme nehmen die elektrische Energie auf und produzieren daraus die betreffenden Substanzen.<sup>[21]</sup>

### 2.1.2 Biofilmaufbau

Biofilme bestehen im Wesentlichen aus drei verschiedenen Komponenten: Mit einem Masseanteil von bis zu 98 % ist Wasser die Hauptkomponente eines jeden Biofilms.<sup>[22]</sup> Es dient als Füllstoff und als Wachstumsmedium für die Zellen. Mit einem Anteil von 10 % am Trockengewicht des Biofilms haben die (Bakterien-) Zellen den kleinsten Anteil an der Gesamtmasse. Trotzdem sind sie der zentrale Bestandteil, weil sie die Extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS) synthetisieren, die mit einem Masseanteil von 90 % am Trockengewicht die Hauptstrukturkomponente des Biofilms darstellen.<sup>[23]</sup> Die EPS bildet den Biofilm und sorgt für seine mechanische Stabilität. Sie besteht aus einer Vielzahl verschiedener Stoffe, deren Zusammensetzung noch weiter differenziert werden kann:

Die größte Gruppe stellen Polysaccharide dar. Ihre Funktion im Biofilm und ihre strukturelle Variabilität (geladen/neutral, linear/verzweigt) ist vielfältig. Als eine ihrer Hauptaufgaben sorgen sie für die Adhäsion und Kohäsion im Biofilm. Dafür bilden sie ein dreidimensionales Polymernetzwerk aus, das die Zellen untereinander und mit der Oberfläche verbindet.<sup>[24]</sup> Des Weiteren können Polysaccharide auch gut hydratisiert werden und so Wasser abspeichern. Außerdem dienen sie den Mikroorganismen auch als Nahrungsspeicher, die in nährstoffarmen Zeiten verstoffwechselt werden können. Zuletzt bieten die Polysaccharide Schutz gegen toxische Ionen und Antibiotika.<sup>[25–27]</sup>

Eine zweite große und wichtige Gruppe sind die Proteine, welche entweder als Strukturprotein oder als Extrazelluläre Enzyme vorliegen. Letztere können ein Verdauungs-System außerhalb der Zellen aufbauen, welches Biopolymere in kleineren Bausteinen vorverdaut.<sup>[23]</sup> Außerdem können sie schützend gegen gefährliche Chemikalien wirken.<sup>[28]</sup> Die Strukturproteine tragen zur Stabilität des Biofilms bei, indem sie die Verbindung zwischen den Zellen und den Polysacchariden verbessern.<sup>[29]</sup>

Als dritte Gruppe treten Lipide und Biotenside auf. In der Anfangsphase unterstützen sie den Adhäsionsprozess, indem sie die Hydrophobie der Zellen modifizieren.<sup>[30]</sup> Im gereiften Biofilm können sie weiterhin die Anlagerung anderer Bakterien verhindern.<sup>[31]</sup>

## 2. Hintergrund

Zuletzt gibt es noch extrazelluläre DNA (eDNA). Diese wird durch die Zellen aktiv segregiert und stammt nicht nur von abgestorbenen Zellen. Sie stützt ebenfalls die Struktur des Biofilms.<sup>[32]</sup> Außerdem werden so auch genetische Information zwischen den Zellen ausgetauscht.<sup>[23]</sup>

Der genaue Aufbau eines Biofilmes lässt sich nicht verallgemeinern. Er hängt immer von den filmbildenden Bakterien, der Oberfläche und den Umgebungsparametern ab.

### 2.1.3 Biofilmwachstum

Die Besiedlung neuer Oberflächen ist für biofilmbildende Bakterien sehr wichtig, da sie sich so ausbreiten und ihr Überleben sichern. Im Allgemeinen wird der Lebenszyklus eines Biofilms in fünf Phasen eingeteilt.

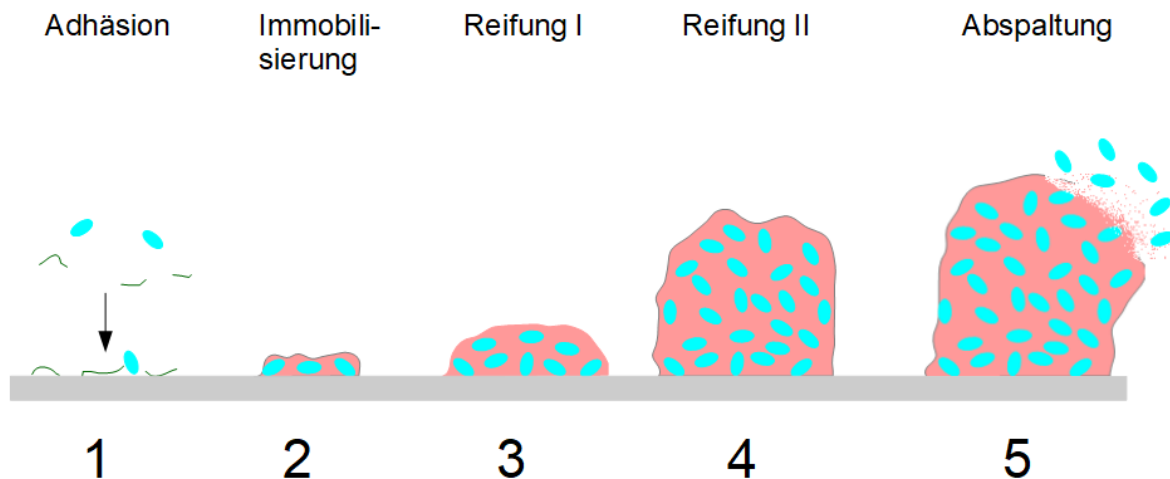


Abbildung 3: Die fünf Phasen der Biofilmentwicklung auf einer Oberfläche: 1: Adhäsion und Konditionierung, 2: Immobilisierung der Zellen, 3: Ausbildung von Mikrokolonien (in 2 Dimensionen), 4: Wachstum der Kolonien (in 3 Dimensionen), 5: Segregation von Zellen oder Biofilmstücken.<sup>[33]</sup>

Abbildung 3 zeigt diese fünf Phasen. In der ersten Phase, der sogenannten Konditionierungsphase, lagern sich zunächst freie Polysaccharide, Proteine, Lipide und Huminsäuren an der Oberfläche an. Dadurch verändern sich die Ladung und das chemische Potential der Oberfläche, wodurch die Zellen besser an der Oberfläche adsorbieren können. Die Adhäsion der Zellen erfolgt in diesem Stadium reversibel aufgrund von van-der-Waals-Kräften und Coulomb Wechselwirkungen.<sup>[34]</sup> Die Zellen können sich noch auf der Oberfläche bewegen, um einen passenden Platz zur Besiedlung zu finden.

In Phase 2 werden die Zellen immobilisiert. Ihr Stoffwechsel stellt sich vom planktonischen Zustand auf den Biofilm-Zustand um. Sie beginnen EPS zu produzieren. Diese lagert sich sowohl an den Zellen als auch an der Oberfläche an, wodurch es zu einer festen Verbindung zwischen Zelle und Oberfläche kommt. Die Anlagerung der Zellen ist nun irreversibel.

In Phase 3 beginnen die Bakterien sich zu teilen, was zur Ausbildung von Mikrokolonien führt. Dabei produzieren die Zellen weiterhin EPS. Das Wachstum der Kolonien beschränkt sich in diesem Zeitraum im Wesentlichen auf zwei Dimensionen entlang der Oberfläche.

In Phase 4, der zweiten Reifungsphase, teilen sich die Zellen und produzieren auch weiterhin EPS. Im Unterschied zu Phase 3 wachsen die Kolonien nun aber in drei Dimensionen.

In der finalen Phase 5 ist der Biofilm gereift und die einzelnen Kolonien sind zu einem durchgehenden Biofilm zusammengewachsen. In dieser Phase beginnen sich einzelne Bakterien oder auch ganze Biofilmsegmente vom Biofilm zu lösen und in die Bulk-Phase überzugehen. Diese können sich wieder an neuen Oberflächen anlagern, womit sich der Kreislauf schließt.

### 2.1.4 Elektrochemisch aktive Biofilme

Eine besondere Form von Biofilmen stellen Elektrochemisch Aktive Biofilme (EAB) dar. In solchen Biofilmen dient eine äußere Elektrode als terminaler Elektronenakzeptor für den bakteriellen Metabolismus. Den ersten Nachweis, dass Mikroorganismen eine äußere Elektrode als Elektronenakzeptor nutzen können, führte POTTER im Jahr 1910.<sup>[17]</sup> Allerdings waren die erreichten Stromdichten so klein, dass diese Technologie zunächst kaum Beachtung fand. Dies änderte sich in den 1980er Jahren, als nach der Ölkrise neue Wege der Energieproduktion erforscht wurden. In dieser Zeit konnten die Leistungsdichten von EABs durch den Zusatz von Mediatoren deutlich gesteigert werden. Die Stromdichten waren jedoch immer noch zu klein für eine wirtschaftliche Nutzung. Weiterhin ist der Zusatz von Mediatoren auch problematisch, weil einerseits viele Mediatoren aufgrund ihrer Toxizität gefährlich für die Umwelt sind und andererseits einen Kostenfaktor darstellen, der das ökonomische Potential mindert. Dieses Problem konnte 1997 gelöst werden, als Bakterien entdeckt worden sind, die von sich aus Mediatoren produzieren.<sup>[35]</sup> Im Jahr 2001 erfolgte dann die Entdeckung des Bakteriums *Geobacter sulfurreducens* durch LOVLEY, das zu einem direkten Elektronentransfer zur Elektrode fähig ist.<sup>[36]</sup> Mittlerweile sind eine Vielzahl an Bakterien bekannt, die elektrochemisch aktive Biofilme bilden.<sup>[37]</sup>

## 2. Hintergrund

Eine wesentliche Eigenschaft von elektrochemisch aktiven Biofilmen ist ihre Fähigkeit, Elektronen von den Zellen durch den Biofilm zur Elektrode zu transportieren. Dafür gibt es mehrere Mechanismen (siehe Abbildung 4). Die erste Möglichkeit ist der Direkte Elektronen Transfer (DET). In diesem Fall werden die Elektronen entweder über äußere Membranproteine auf die Anode übertragen oder über Pili.<sup>[38]</sup> Pili sind elektrisch leitfähige, fadenförmige Strukturen, die von bestimmten Zellen ausgebildet werden können. Der genaue Leitungsmechanismus innerhalb der Pili ist noch Gegenstand aktueller Diskussion.<sup>[39,40]</sup> Messungen der Temperaturabhängigkeit der Leitfähigkeit weisen auf einen metallartigen Charakter des Mechanismus hin.<sup>[41]</sup>

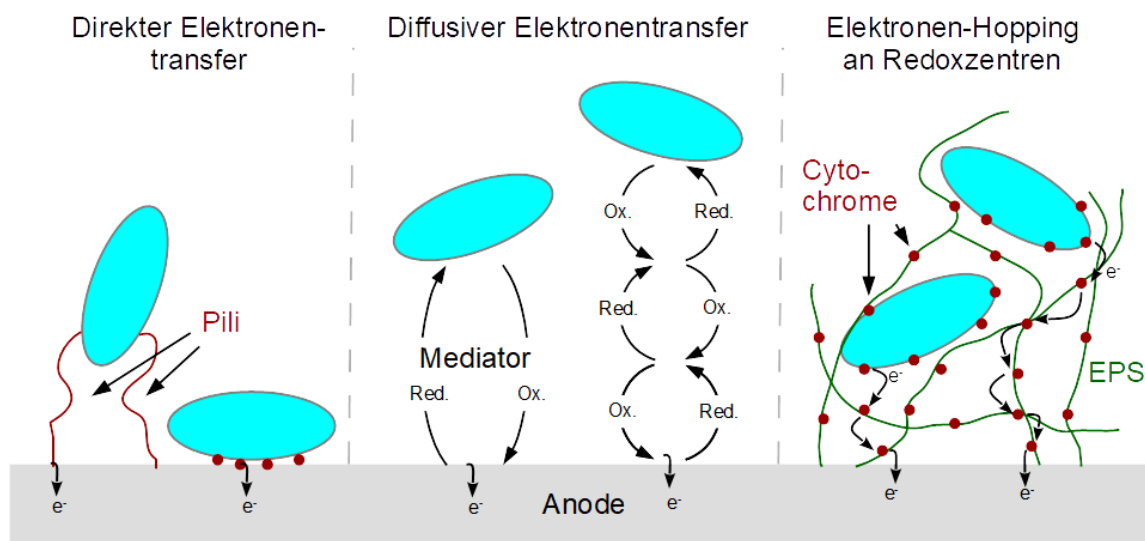


Abbildung 4: Mechanismen für den Elektronentransport innerhalb von elektrochemisch aktiven Biofilmen.<sup>[42]</sup>

Die zweite Möglichkeit ist der Transport über Mediatoren. Dabei handelt es sich um redox-aktive Moleküle, die zwischen den Zellen und der Anode diffundieren und so die Elektronen von der Zelle zur Anode transportieren („Elektronenshuttle“). Dabei muss nicht ein Molekül die komplette Strecke zurücklegen. Es kann auch zu einer Elektronenabgabe an ein anderes Mediatormolekül im Lösungsmittel kommen. Mediatoren können von außen zugesetzt oder von den Zellen produziert werden.

Die dritte Möglichkeit ist das Elektronen-Hopping. Dafür werden Redoxzentren (z.B. Cytochrome) in die EPS und in die äußeren Zellmembranen eingebaut. In diesen Fall können die Elektronen von einem Redoxzentrum zum nächsten springen bis sie schließlich die Anode erreichen.<sup>[43]</sup>

Die elektrische Effizienz, die ein EAB erreicht, hängt von verschiedenen Parametern ab. Abbildung 5 stellt diese Abhängigkeiten schematisch dar. Einerseits hängt die Leistung von der



Geschwindigkeit des Metabolismus der Zellen ab. Andererseits trägt der Transport von Nährstoffen, Abfallstoffen und Ladung zur Leistungsfähigkeit bei. Für eine gute Leistungsdichte muss die Nährstoffkonzentration (z.B. an Acetat) im Biofilm ausreichen groß sein. Das Acetat muss aus der Bulk-Phase in den Biofilm diffundieren. Beim Abbau des Acetats entstehen Kohlenstoffdioxid und Oxonium-Ionen. Diese Stoffe müssen wieder aus dem Biofilm heraus in die Bulk-Phase diffundieren. Vor allem der Transport des Oxonium-Ions ist wichtig, da es sonst zu einer Verschiebung des pH-Werts innerhalb des Biofilms kommen kann, wodurch der Zellmetabolismus und der Ladungstransport gestört werden können.<sup>[44]</sup> Zuletzt muss auch der Ladungstransport von den Zellen zur Elektrode ausreichend schnell sein.

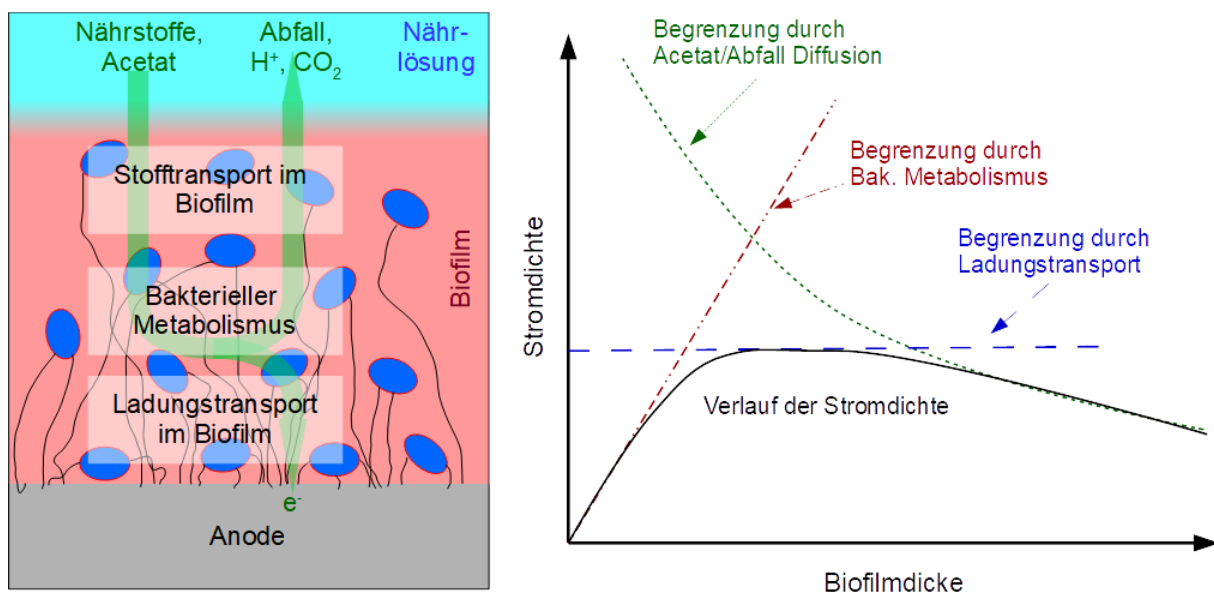


Abbildung 5: Stoff- und Ladungstransport innerhalb eines elektrochemisch aktiven Biofilms. Ist der Bakterielle Metabolismus begrenzend, steigt die Stromdichte linear mit der Dicke an. Ist der Ladungstransport begrenzend, gibt es aufgrund der maximalen Pililänge eine maximale Stromdichte. Ist die Acetat- bzw. Abfalldiffusion strombegrenzend, fällt die Stromdichte mit der Dicke zunehmend ab.

Im Falle von sehr dünnen Biofilmen ist vor allem die Geschwindigkeit des Zellmetabolismus entscheidend – die Stromdichte ist proportional zu Biofilmdicke. Bei dickeren Biofilmen wirken die Transportprozesse zunehmend begrenzend. Dann kommt es zu dem Problem, dass die äußeren Bakterien zwar gut mit Nährstoffen versorgt sind, aber dafür weit von der Anode entfernt sind, wodurch der Ladungstransport schwierig wird. Die inneren, elektrodennahen Zellen haben das entgegengesetzte Problem. Sie sind zwar nah an der Elektrode, aber weit von der Bulk-Phase entfernt, sodass nur wenige Nährstoffe bei ihnen ankommen, weil diese erst durch den ganzen Biofilm diffundieren müssen und dabei von anderen Bakterien verbraucht werden.

## 2. Hintergrund

### 2.2 Das Bakterium *Geobacter sulfurreducens*

*Geobacter sulfurreducens* ist ein gramnegatives, obligat anaerobes Proteobakterium. Es besteht aus unbeweglichen Stäbchen mit einer Länge von 2–3  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 0.5  $\mu\text{m}$ . Erstmals entdeckt wurde diese Art 1987 durch LOVLEY in Sedimenten des Potomac Rivers.<sup>[45]</sup> In der Natur wächst *Geobacter sulfurreducens* auf Sedimenten und nutzt diese als terminalen Elektronenakzeptor. Dementsprechend sind Biofilme von *Geobacter sulfurreducens* elektrochemisch aktiv. Er ist ein guter Biofilmbildner. Die Biofilme sind auch ohne Zugabe von Mediatoren aufgrund von Cytochromen und Pili leitfähig.<sup>[43,46]</sup> Im Vergleich zu anderen Biofilmen sind die Biofilme von *Geobacter sulfurreducens* besonders reich an Proteinen, die einen Großteil der segregierten EPS ausmachen. Ein Großteil der EPS ist gut löslich bzw. nur schwach an den Biofilm gebunden.<sup>[47]</sup>

Durch den Einsatz bestimmter Mischkulturen kann die elektrische Leistungsfähigkeit erhöht werden, wenn die anderen Bakterien Mediatoren produzieren.<sup>[48]</sup> Außerdem bieten Mischkulturen einen erhöhten Schutz gegen Sauerstoff, weil dieser durch fakultativ aerobe Bakterien verbraucht werden kann, wodurch der Biofilm im Inneren anaerob bleibt. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit abwasserbasierte Biofilme von *Geobacter sulfurreducens* verwendet.

#### 2.2.1 Acetatstoffwechsel

*Geobacter sulfurreducens* kann nur wenige, niedermolekulare Verbindungen verstoffwechseln. Sein bevorzugter Elektronendonator ist Acetat.<sup>[49]</sup> Er wächst aber auch mit Lactat oder Formiat.<sup>[3]</sup> Elementarer Wasserstoff kann auch als Elektronendonator dienen. Allerdings erfolgt mit Wasserstoff allein kein Biofilmaufbau, weil das Vorhandensein von Kohlenstoff essentiell für den Biofilmaufbau ist.<sup>[49]</sup> Sollen komplexere organische Verbindungen (Zucker, Fette...) als Kohlenstoffquelle verwertet werden, kann dies durch die Verwendung von Mischkulturen erreicht werden. Die anderen Bakterien spalten die komplexen Verbindungen in kleinere Moleküle wie Acetat auf, welches von *Geobacter sulfurreducens* zu Stromproduktion eingesetzt werden kann.<sup>[50]</sup> Es entsteht eine Symbiose zwischen den einzelnen Bakterien.

Abbildung 6 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung des Acetat-Metabolismus von *Geobacter sulfurreducens*. Der Metabolismus beginnt mit der Bildung des Acetyl-CoA Komplexes, einem zentralen Molekül der Chemie aller Organismen. Normalerweise erfolgt die Bildung aus Acetat über die Acetatkinase und die Phosphatransacetylase. *Geobacter sulfurreducens* bevorzugt jedoch den Weg über die Acetyl-CoA-Transferase in Kopplung an die Succinyl-CoA/Succinat Reaktion.<sup>[51]</sup> Dieser Weg ist effizienter, weil die alternative Reaktion über

die Succinyl-CoA-Synthetase eine Gleichgewichtsreaktion mit einer ungünstigen Gleichgewichtslage darstellt, welche den komplette Metabolismus verlangsamen würde.<sup>[52]</sup>

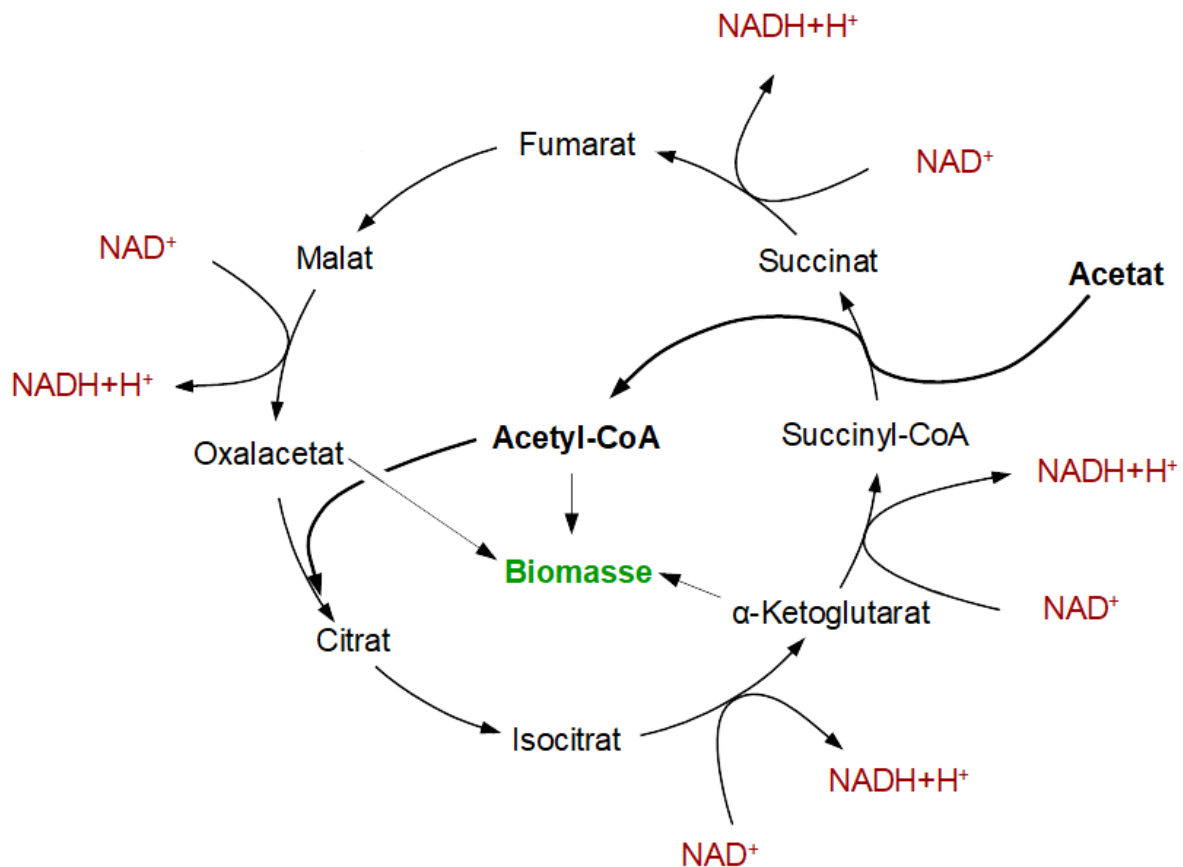
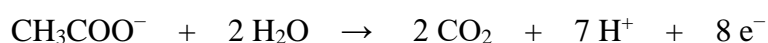


Abbildung 6: Vereinfachte schematische Darstellung des Metabolismus von *Geobacter sulfurreducens*.<sup>[52,53]</sup> NADH dient der Atmungskette als Energielieferant für die ATP Produktion.

Das Acetyl-CoA kann entweder zum Aufbau von Biomasse verwendet werden oder zu CO<sub>2</sub> zur Energiegewinnung abgebaut werden. Beim Aufbau von Biomasse ist es das Edukt für die Synthese von Fetten, Kohlenhydraten und einigen Aminosäuren. Andererseits kann Acetyl-CoA auch in den Citratzyklus eingebracht werden. Auch aus Verbindungen des Citratzyklus kann Biomasse aufgebaut werden, indem aus den Verbindungen Aminosäuren synthetisiert werden. Wird der Citratzyklus hingegen komplett durchlaufen, dann wird das Acetat komplett zu CO<sub>2</sub> abgebaut.



Bei dieser Redoxreaktion werden Elektronen in Form eines Hydridions an Nicotinamadenin-dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) übertragen, welches zu NADH reduziert wird. Diese energiereiche Verbindung dient der Atmungskette als energielieferndes Coenzym für die Synthese von Adeno-sintriphosphat (ATP). Die Effektivität der Atmungskette hängt bei *Geobacter sulfurreducens* vom Potential der äußeren Elektrode ab, weil diese als terminaler Elektronenakzeptor dient.

## 2. Hintergrund

### 2.2.2 Atmungskette und äußere Cytochrome

Die Atmungskette in einer Zelle stellt einen Komplex aus diversen Membranproteinen dar, deren Aufgabe es ist  $\text{NAD}^+$  aus  $\text{NADH}$  zurückzubilden und dabei ATP zu produzieren. In Bakterien befinden sich die Enzyme der Atmungskette in der Zellmembran, die aus einer äußeren und einer inneren Doppellipidschicht aufgebaut ist. Der Prozess beginnt mit der NADH Dehydrogenase. Diese oxidiert das  $\text{NADH}$  und nimmt die Elektronen auf. An diese Reaktion gekoppelt ist ein Pumpmechanismus, der Protonen aus dem Zytoplasma in das Periplasma pumpt. Der so aufgebaute Protonengradient kann von ATPasen zur ATP Produktion verwendet werden, dessen Synthese an den Rückfluss der Protonen aus dem Periplasma ins Zytoplasma gekoppelt ist. Aus einem Mol Acetat können bis zu elf Mol ATP gewonnen werden.<sup>[54]</sup>

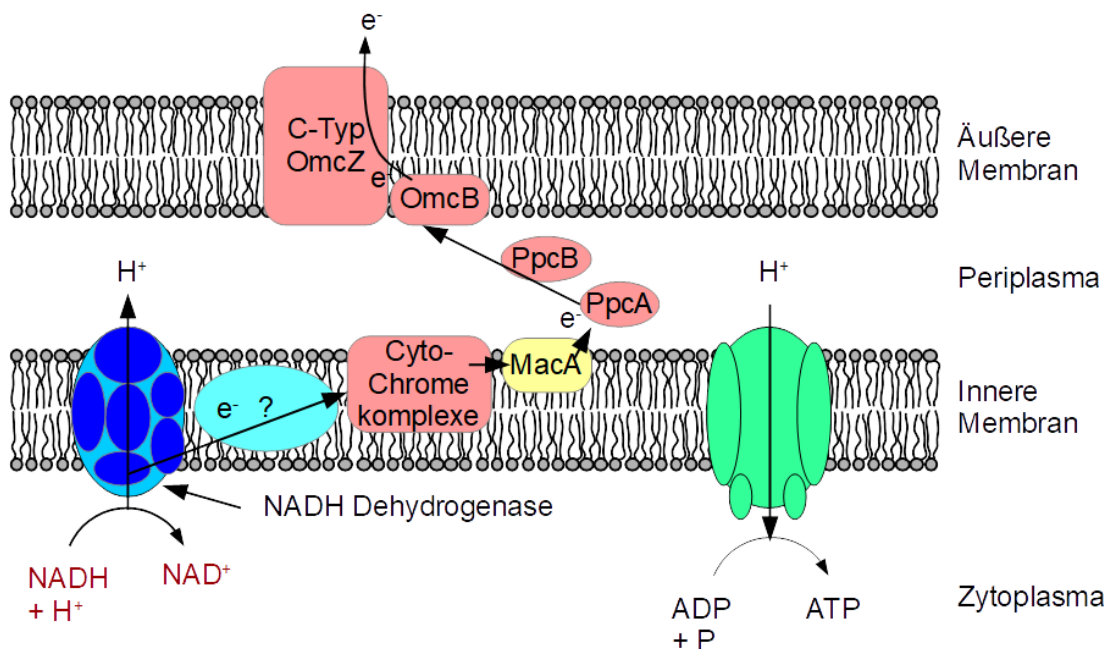


Abbildung 7: Aufbau der Atmungskette von *Geobacter sulfurreducens*. Die Leitung der Elektronen erfolgt primär über Cytochrome in der inneren Membran (MacA), im Periplasma (PpcA, PpcB) und in der äußeren Membran (OmcB, OmcZ). Dort werden die Elektronen an Pili oder Mediatoren übergeben und zur Anode abgeleitet. Die Bildung von ATP erfolgt über ATPasen in der inneren Membran. Diese nutzen einen Protonengradienten zur ATP-Synthese, der durch die NADH Dehydrogenase aufgebaut wird.<sup>[55]</sup>

Die Elektronen werden von der NADH Dehydrogenase an weitere Redoxsysteme in der inneren Zellmembran weitergereicht. In aeroben Bakterien würde an dieser Stelle eine mehrschrittige Übertragung an Sauerstoff stattfinden. *Geobacter sulfurreducens* ist aber anaerob und nutzt extrazelluläre Elektronenakzeptoren. In Folge dessen müssen die Elektronen aus der inneren Membran durch das Periplasma und durch die äußere Membran befördert werden. Dafür besitzt *Geobacter sulfurreducens* eine Kette aus Redoxzentren in Form von Cytochromen in der inneren Membran (MacA), im Periplasma (PpcA, PpcB) und in der äußeren Membran

(OmcZ), die für die Weiterleitung verantwortlich sind und die Elektronen nach außen transportieren. In Tabelle 1 sind sie Redoxpotentiale der Cytochrome dargestellt.

Tabelle 1: Potential verschiedener Cytochrome von *Geobacter sulfurreducens*.<sup>[56]</sup>

Protein	Position	Molare Masse [kDa]	Potential gg. SCE [mV]
MacA	IM	36.3	-429
GSU1996	P	42.3	-365
PpcA	P	9.6	-358
PpcB	P	9.6	-378
PpcC	P	9.6	-384
PpcD	P	9.6	-373
PpcE	P	9.7	-375
OmcZc	OM	32.7	-461
OmcF	OM	11	-61
OmcS	OM	46.8	-453

Das Redoxpotential der äußeren Cytochrome ist entscheidend für die Leistungsfähigkeit der Zellen. Nur wenn das Potential des terminalen Elektronenakzeptors größer ist als das Redoxpotential der Cytochrome, kann eine Elektronenübertragung stattfinden. Die genaue Zusammensetzung der Cytochrome ist unbekannt und kann auch sich auch von Biofilm zu Biofilm unterscheiden.

## 2. Hintergrund

## 3 Theorie

### 3.1 Impedanzspektroskopie

#### 3.1.1 Allgemeines

Die Impedanzspektroskopie ist eine elektrische Untersuchungsmethode, bei der der Wechselstromwiderstand (Impedanz)  $\tilde{Z}$  bzw. der komplexe Leitwert (Admittanz)  $\tilde{Y}$  einer Probe als Funktion der Frequenz der Wechselspannung ermittelt wird. Admittanz und Impedanz sind zueinander invers.

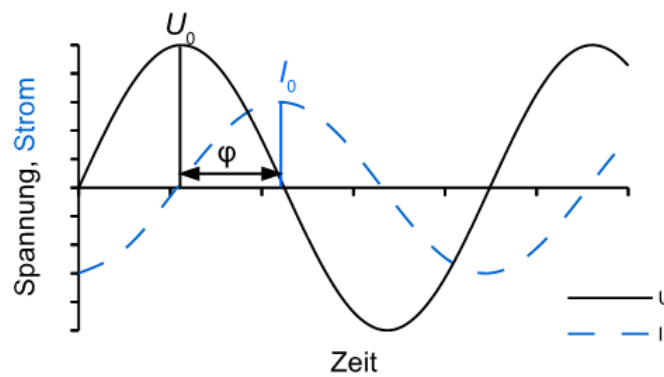


Abbildung 8: Strom- und Spannungsverlauf bei einer Impedanz-Messung.

Für die Messung wird die Probe mit einem Impedanzanalysator verbunden. Der Analysator gibt eine Wechselspannung bestimmter Frequenz aus und detektiert den Strom als Antwortsignal (siehe Abbildung 8). Die Impedanz berechnet sich aus der Phasenverschiebung  $\varphi$  zwischen Strom und Spannung und aus den Amplituden des Stromes  $I_0$  und der Spannung  $U_0$ .

$$\tilde{Z} = \frac{1}{\tilde{Y}} = \frac{U_0}{I_0} e^{i\varphi} \quad (1)$$

Da es zwischen Strom und Spannung zu einer Phasenverschiebung kommen kann, ist  $\tilde{Z}$  eine komplexe Zahl. Die Analyse wird für verschiedene Frequenzen wiederholt. Daraus resultiert der Frequenzgang von  $\tilde{Z}(\omega)$ .

Mithilfe dieser Impedanz-Kurven können Aussagen über die elektrischen Eigenschaften der Probe getroffen werden. Dafür wird zunächst ein Äquivalenzschaltkreis erarbeitet. Dies ist ein elektrischer Schaltkreis, welcher aus elektrischen Komponenten wie z.B. Ohm'schen Widerständen oder Kondensatoren besteht, dessen Gesamtimpedanz die Impedanz der Probe widerspiegelt. Aus der Anpassung der Impedanz des Äquivalenzschaltkreises an die Impedanz der

### 3. Theorie

Probe werden die Parameter der elektrischen Komponenten erhalten. Aus diesen Parametern können Aussagen über die inneren Vorgänge in der Probe getroffen werden.

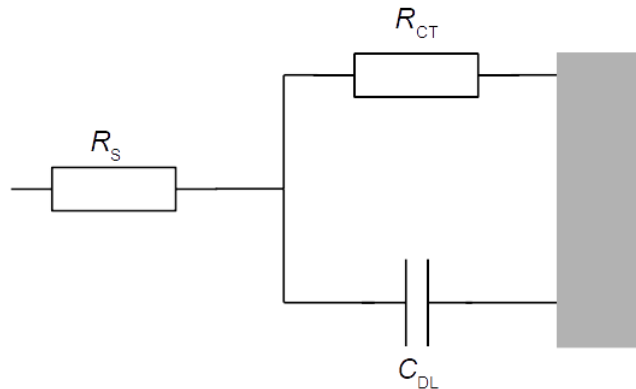


Abbildung 9: (Vereinfachter) Randles Ersatzschaltkreis.

Ein in der Elektrochemie häufig verwendetes Ersatzschaltbild ist der sogenannte Randles Ersatzschaltkreis (siehe Abbildung 9). Er bildet eine Elektrode in einer Lösung ab und besteht aus einem Ohm'schen Widerstand  $R_{CT}$  mit parallel geschaltetem Kondensator  $C_{DL}$ . Diese repräsentieren den Widerstand der Ladungsübertragung von der Elektrode auf die Lösung (Charge-Transfer Widerstand,  $R_{CT}$ ) sowie die Kapazität der Doppelschicht an der Elektrodenoberfläche. In Serie zu diesen ist ein weiterer Ohm'scher Widerstand  $R_s$  geschaltet, der den Widerstand der Lösung repräsentiert. Nach den Kirchhoff'schen Regeln errechnet sich die Gesamtimpedanz  $\tilde{Z}$  als:

$$\tilde{Z} = R_s + \frac{1}{\frac{1}{R_{CT}} + i\omega C} \quad (2)$$

#### 3.1.2 Constant Phase Element

In komplexen Systemen, wie z.B. bei rauen oder porösen Strukturen, kann die Doppelschicht häufig nicht durch einen idealen Kondensator modelliert werden. In diesem Fall kommt häufig ein Constant Phase Element (CPE) zur Anwendung. Seine Impedanz  $\tilde{Z}_{CPE}$  ist definiert als:

$$\tilde{Z}_{CPE} = \frac{1}{Q_0 \omega^\mu} e^{-\frac{\pi}{2}\mu i} \quad (3)$$



$Q_0$  ist die Pseudo-Kapazität des CPE,  $\omega$  ist die Kreisfrequenz und  $\mu$  ein Nichtidealitätsparameter. Die Phase des Constant Phase Element beträgt  $-(90 \times \mu)^\circ$  und ist konstant. Für  $\mu = 1$  beschreibt das CPE einen idealen Kondensator, für  $\mu = 0$  ist es ein Ohm'scher Widerstand und für  $\mu = -1$  ist es eine Induktivität (i.d.R. ist  $\mu > 0$ ). Das CPE ist im Wesentlichen ein empirischer Parameter, der eingesetzt werden kann, um eine Verbreiterung der Impedanzkurven zu beschreiben. Eine genaue physikalische Interpretation ist schwierig.<sup>[57]</sup> Sie kann aber bei rauen Oberflächen durch die langsamere Porendiffusion erklärt werden, weil in diesem Fall die Doppelschicht-Kapazität von der Frequenz abhängt, was zu einer Verbreiterung der Impedanzkurve führt.

### 3.2 Schwingquarz-Mikrowaage

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Schwingquarz-Mikrowaage (Quartz Crystal Microbalance, QCM) zu einem wertvollen Messgerät entwickelt. Die Grundlage für die QCM erarbeiteten Lord Kelvin und die Gebrüder Curie mit ihren Experimenten zum piezoelektrischen Effekt am Ende des 19. Jahrhunderts. Zunächst galt dieser jedoch nur als wissenschaftliche Kuriosität. 1917 erfolgte die erste Anwendung eines Quarzsensors in Form eines Entfernungsmessgeräts.<sup>[58]</sup> In den 20er und 30er Jahren wurden die ersten Oszillatorschaltkreise mithilfe von Quarzresonatoren entwickelt. Dadurch wuchs ihre Bedeutung als Frequenzgeber in elektrischen Systemen. Nach dem zweiten Weltkrieg entwickelten sich Quarzresonatoren schließlich zu einem Massenprodukt.

Die erste Anwendung als Mikrowaage zur Bestimmung von Massen erfolgte 1959 durch Sauerbrey.<sup>[59]</sup> Er beschränkte sich zunächst auf reine Wägungsversuche im Vakuum. In den 80er Jahren erkannte man schließlich, dass sich aus der Bandbreitenverschiebung Informationen über die dissipativen Effekte der Probe gewinnen lassen. Die QCM-D (D steht für Dissipation) war geboren. Heute hat die Schwingquarz-Mikrowaage über die Gravimetrie hinaus ein breites Anwendungsspektrum in der Sensorik. Dazu gehört die Kontaktmechanik, die Elektrochemie oder auch die Biotechnologie.<sup>[60]</sup>

#### 3.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Schwingquarz-Mikrowaagen bestehen in der Regel aus monokristallinem Siliziumdioxid (Quarz). Wird auf einen Quarzkristall ein mechanischer Druck ausgeübt, der den Kristall deformiert, dann kommt es aufgrund des fehlenden Inversionszentrums zu einer asymmetrischen Verschiebung der Ladungsträger im Kristallgitter zueinander. Der positive und der negative Ladungsschwerpunkt liegen nicht mehr übereinander. Die Oberflächen laden sich auf und ein

### 3. Theorie

Dipol entsteht. Die Oberflächenladung ist proportional zur mechanischen Deformation (siehe Abbildung 10). Dies wird als piezoelektrischer Effekt (von altgr.  $\pi\acute{\epsilon}\zeta\epsilon\iota\nu$ , drücken) bezeichnet.

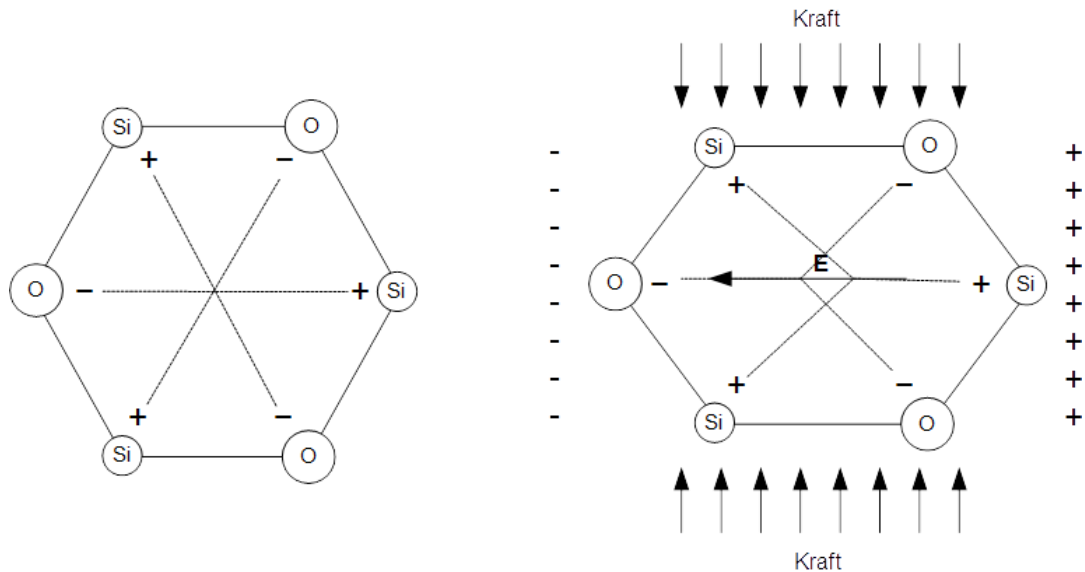


Abbildung 10: Piezoelektrischer Effekt in einem Quarzkristall. Ohne äußere Kraft liegen die Ladungsschwerpunkte übereinander. Wird der Kristall vertikal deformiert, kommt es durch die Verschiebung der Ladungsschwerpunkte zur Ausbildung eines Dipols in horizontaler Richtung.

Dieser Effekt kann auch umgekehrt werden. Wird ein Quarzkristall in ein elektrisches Feld eingebracht, dann führt dies zu einer mechanischen Deformation des Quarzkristalls (inverser piezoelektrischer Effekt). Durch ein elektrisches Wechselfeld wird der Kristall in Schwingung versetzt. Wie jedes schwingungsfähige mechanische System besitzt der Quarzresonator eine Resonanzfrequenz mit entsprechenden Obertönen. In dieser Arbeit wird die Fundamentalfrequenz  $f_0$  als 1. Oberton bezeichnet, damit aus der Zahl direkt die Obertonordnung entnommen werden kann. Die Resonanzfrequenz des  $n$ -ten Obertons befindet sich in etwa bei einer Frequenz von  $n \times f_0$ . Es können immer nur die Obertöne elektrisch angeregt werden, bei denen es bei der Deformation aufgrund des piezoelektrischen Effekts zu einem elektrischen Dipol parallel zum elektrischen Feld kommt. Bei einem Dicken-Scher-Resonator ist dies nur bei den ungeraden Obertönen ( $n = 1, 3, 5 \dots$ ) der Fall.

Die Schwingungsart und Schwingungsfrequenz hängen von den geometrischen Eigenschaften des Quarzkristalls ab. Dabei kommt es darauf an, wie der Quarzresonator aus dem Quarzkristall herausgeschnitten worden ist. Für die Anwendung als Schwingquarz-Mikrowaage werden häufig Dicken-Scher-Resonatoren verwendet, die in einem AT-Schnitt (Schnittwinkel  $35^\circ 15'$  relativ zu einem Schnitt senkrecht zur  $z$ -Achse) aus einem Quarzeinkristall herausgeschnitten worden sind. Solche Quarze besitzen eine besonders stabile Schwingungsform und eine geringe Temperaturabhängigkeit der Fundamentalfrequenz.

### 3.2.2 Datenaufnahme mittels Impedanzspektroskopie

Die Anregung des Schwingquarzes erfolgt mit einem Impedanzanalysator. Die Impedanz des Quarzresonators lässt sich durch den in Abbildung 11 A dargestellten Butterworth-van-Dyke Schaltkreis beschreiben. Dieser besteht aus zwei Zweigen: Der erste Zweig ist ein Schwingkreis, bestehend aus einem Kondensator, einer Induktivität und einem Ohm'schen Widerstand. Dieser Teil bildet die mechanischen Eigenschaften des Resonators ab. Der Ohm'sche Widerstand  $R_1$  entspricht einem mechanischen Dämpfer, die mechanische Kapazität  $C_1$  einer mechanischen Feder und die Induktivität  $L_1$  der Masse.

Der zweite Zweig besteht aus einem einzelnen Kondensator  $C_0$ , der parallel zum Schwingkreis geschaltet ist. Dieser repräsentiert einen Kondensator, der durch die elektrische Aufladung des Resonators entsteht.

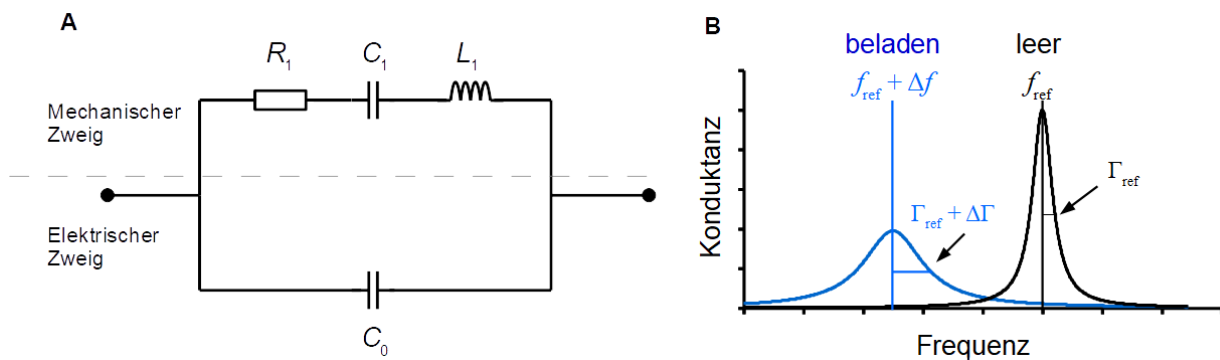


Abbildung 11: A: Butterworth-van Dike Ersatzschaltkreis. Dieser Schaltkreis dient als Ersatzschaltbild für einen Schwingquarz.<sup>[61]</sup> B: Resonanzkurven eines leeren und eines beladenen Quarzresonators.

Es werden die Impedanzen für einen Frequenzbereich nahe der Resonanzfrequenzen gemessen. Daraus ergeben sich die in Abbildung 11 B dargestellten Resonanzkurven. Dargestellt ist in diesem nur Fall die Konduktanz, also der Realteil der Admittanz. Das Maximum der Konduktanz befindet sich bei der Resonanzfrequenz  $f$ . Die Bandbreite  $\Gamma$  ist die halbe Breite der Resonanzkurve auf der halben Höhe des Maximums.

Wird der Resonator in irgendeiner Form mit einer Last beladen, dann kommt es zu einer Verschiebung der Resonanzkurve, wobei sich sowohl die Resonanzfrequenz als auch die Bandbreite ändern können.

$$\Delta f = f - f_{\text{Ref}} \quad (4)$$

$$\Delta \Gamma = \Gamma - \Gamma_{\text{Ref}} \quad (5)$$

### 3. Theorie

Diese Verschiebungen der Resonanzfrequenz  $\Delta f$  und der Bandbreite  $\Delta\Gamma$  sind die wesentlichen Messparameter der Schwingquarz-Mikrowaage. Der Referenzzustand ( $f_{\text{Ref}}$ ,  $\Gamma_{\text{Ref}}$ ) kann frei gewählt werden. In der Regel ist es der Resonator in Luft oder im Messmedium.

Zur Vereinfachung werden die Bandbreitenverschiebung und die Frequenzverschiebung zu einer komplexen Frequenzverschiebung  $\Delta\tilde{f}$  zusammengefasst, wobei  $\Delta f$  den Realteil und  $\Delta\Gamma$  den Imaginärteil stellt.

$$\Delta\tilde{f} = \Delta f + i\Delta\Gamma \quad (6)$$

#### 3.2.3 Small-Load-Approximation

Die zentrale Gleichung für die Arbeit mit der Schwingquarz-Mikrowaage liefert die Small-Load-Approximation. Diese stellt den Zusammenhang zwischen der akustischen Impedanz einer Beladung (Lastimpedanz  $\tilde{Z}_L$ ) und der Frequenzverschiebung  $\Delta\tilde{f}$  her. Dafür werden zwei wichtige Näherungen getroffen. Erstens wird angenommen, dass die Lastimpedanz kleiner als die Quarzimpedanz  $Z_Q$  ist. Zweitens soll die Verschiebung  $\Delta f$  deutlich kleiner als die Fundamentalfrequenz  $f_0$  sein, sodass die Auswertung der Lastimpedanz bei der Referenzfrequenz erfolgen kann. Dann ergibt sich für die Frequenzverschiebung  $\Delta\tilde{f}$ :<sup>[62]</sup>

$$\frac{\Delta\tilde{f}}{f_0} = \frac{i}{\pi Z_Q} \frac{\langle \hat{\sigma}_S \rangle_{\text{area}}}{\hat{v}_S} = \frac{i}{\pi Z_Q} \tilde{Z}_L \quad (7)$$

$Z_q$  ist die akustische Impedanz des Quarzes,  $f_0$  ist die Fundamentalfrequenz. Die Lastimpedanz  $\tilde{Z}_L$  ist der Quotient aus der flächengemittelten Scherspannung  $\langle \hat{\sigma}_S \rangle_{\text{area}}$  und der Schergeschwindigkeit  $\hat{v}_S$ . Der große Vorteil dieser Gleichung ist, dass die Lastimpedanz keine Ansprüche an die Natur der „Last“ stellt. Daher kann diese Gleichung für eine Vielzahl von Anwendungen benutzt werden. Es muss nur ein passender Ausdruck für die Lastimpedanz gefunden und eingesetzt werden.

### 3.2.4 Sauerbrey Fall

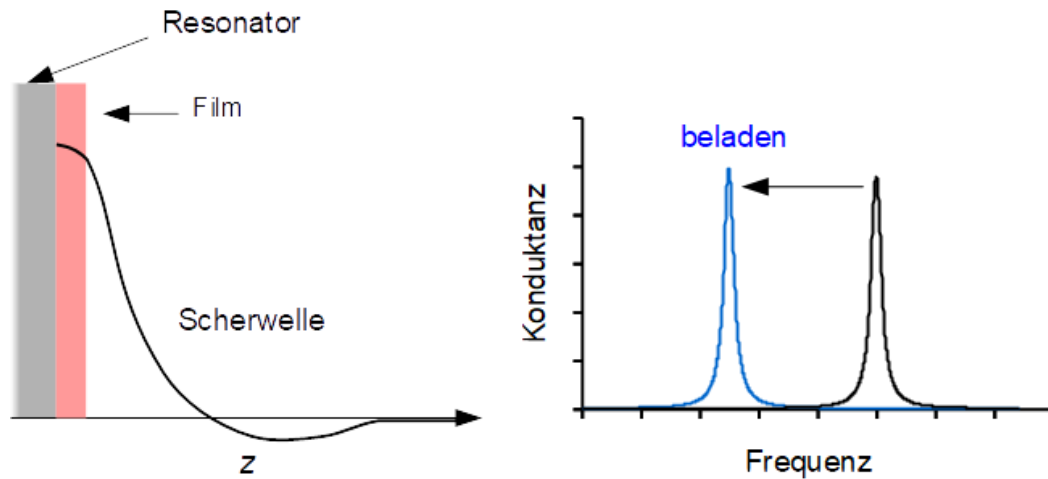


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Sauerbrey-Falls. Der Film ist dünn. Die Scherwelle dissipiert ihre Energie zum Großteil außerhalb des Films. Die Resonanzkurve verschiebt sich bei gleichbleibender Form.

Die älteste Anwendung der QCM ist die Massen bzw. Schichtdickenbestimmung von Filmen auf dem Quarzresonator. Das Verfahren wurde erstmals von SAUERBREY 1959 beschrieben.<sup>[59]</sup> Der Sauerbrey-Ansatz ist gültig für alle Systeme, bei denen die Massenträgheit der Last das Verhalten auf dem Resonator dominiert. Dies ist bei akustisch dünnen Filmen, die nicht zu weich sind, oder auch bei Nanopartikeln der Fall. Die Lastimpedanz  $\tilde{Z}_L$  berechnet sich für den Sauerbrey-Fall aus der Kreisfrequenz  $\omega$ , der Filmmasse  $m_f$  und der aktiven Fläche  $A$ :

$$\tilde{Z}_L = i\omega \frac{m_f}{A} \quad (8)$$

Einsetzen von Gleichung (8) in Gleichung (7) unter der Beachtung, dass  $\omega = 2\pi n f_0$  ist, ergibt für die Frequenzverschiebung im Sauerbrey-Fall:

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{2n f_0}{Z_Q} \frac{m_f}{A} \quad (9)$$

Die Frequenzverschiebung ist negativ und proportional zur Filmmasse  $m_f$  pro Einheitsfläche. Aus Gleichung (9) ergeben sich zwei wichtige Charakteristika für den Sauerbrey-Fall: Zum einen die Abhängigkeit von der Obertonordnung  $n$ . Diese geht linear in die Gleichung ein. Daraus folgt das  $\Delta f(n)/n = \text{const.}$  Zum anderen ist der Imaginärteil gleich null, weshalb auch die Bandbreitenverschiebung null ist.

### 3. Theorie

#### 3.2.5 Kanazawa-Gordon-Fall

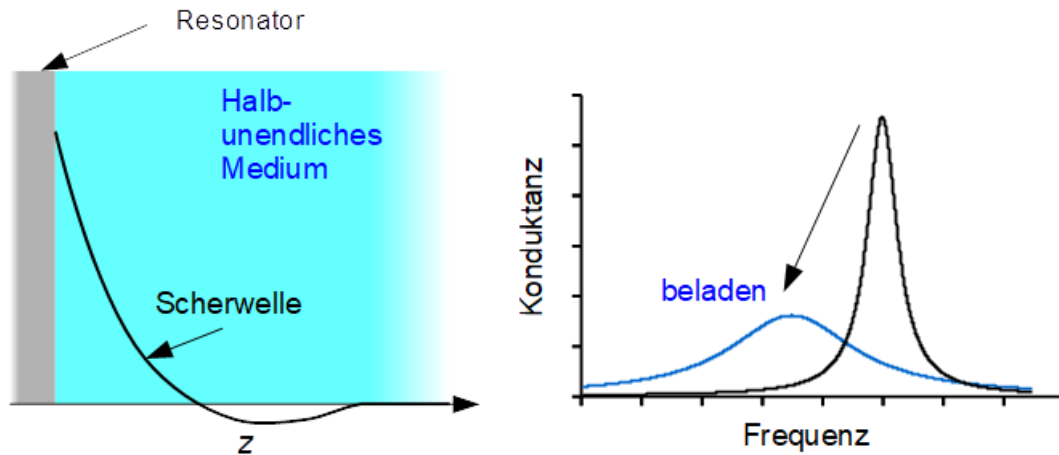


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Kanazawa-Gordon-Falls. Das Medium ist halbunendlich. Die Scherwelle dissipiert komplett im Medium. Die Resonanzkurve verschiebt sich und wird breiter.

Wird ein Quarzresonator in eine Flüssigkeit eingetaucht, dann wird die Scherwelle komplett im Medium dissipiert. Die Ausdehnung des Mediums ist für den Resonator daher halbunendlich. In diesem Fall beeinflusst die Viskosität des Mediums das Schwingverhalten des Resonators. Die Lastimpedanz  $\tilde{Z}_L$  berechnet sich in diesem Fall aus der Dichte  $\rho$  und der Viskosität  $\eta$  der Flüssigkeit.

$$\tilde{Z}_L = \sqrt{i\omega\rho\eta} \quad (10)$$

Einsetzen von Gleichung (10) in Gleichung (7) ergibt für die Frequenzverschiebung:

$$\frac{\Delta\tilde{f}}{f_0} = (-1 + i) \sqrt{\frac{nf_0}{Z_Q^2\pi}} \sqrt{\rho\eta} \quad (11)$$

Diese Abhängigkeit der Frequenzverschiebung von der Viskosität ist als der Kanazawa-Gordon Fall bekannt, obwohl dieser Zusammenhang bereits vorher bekannt war.<sup>[63–67]</sup> Gleichung (11) zeigt des Weiteren, dass in diesem Fall die negative Frequenzverschiebung gleich der Bandbreitenverschiebung ist. Beide sind proportional zur Wurzel des Viskositäts-Dichte-Produkts. Die Frequenzverschiebungen skalieren zueinander mit der Wurzel der Obertonordnung  $\sqrt{n}$ .

#### 3.2.6 Viskoelastische Medien

Gleichung (11) kann für viskoelastische Medien verallgemeinert werden. In diesem Fall ist die Lastimpedanz gegeben durch die Dichte  $\rho$  und dem komplexen Schermodul  $\tilde{G}$ :<sup>[68]</sup>

$$\tilde{Z}_L = \sqrt{\rho \tilde{G}} \quad (12)$$

Einsetzen von Gleichung (12) in Gleichung (7) ergibt:

$$\frac{\Delta \tilde{f}}{f_0} = \frac{i}{\pi \tilde{Z}_q} \sqrt{\rho(G' + iG'')} \quad (13)$$

Die Frequenzverschiebung und auch die Bandbreitenverschiebung sind beide abhängig sowohl vom Speichermodul  $G'$  als auch vom Verlustmodul  $G''$ . Dadurch kommt es auch zu dem etwas unerwarteten Effekt, dass eine Erhöhung des Speichermoduls zu einer höheren Bandbreite (= höheren Dissipation) führt. Der Grund für dieses Verhalten hängt mit der Eindringtiefe  $\delta$  der Scherwelle in das Medium zusammen:

$$\delta = -\frac{1}{\omega \sqrt{\rho}} \frac{|\tilde{G}|}{\text{Im}(\sqrt{\tilde{G}})} \quad (14)$$

Wenn  $G'$  ansteigt, nimmt auch die Eindringtiefe in das Medium zu. Durch die größere Eindringtiefe kann mehr Energie im Medium dissipiert werden und  $\Delta \Gamma$  steigt an.

### 3.2.7 Akustischer-Multilayer-Formalismus

Bisher wurden mit dem Sauerbrey-Fall (Kap. 3.2.4) und dem Kanazawa-Gordon-Fall (Kap. 3.2.5) zwei Grenzfälle betrachtet. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Biofilmen handelt es sich allerdings um wachsende, viskoelastische Filme, deren Verhalten sich in der Wachstumsphase stark ändern kann. Diesem komplexen Verhalten wird weder der Sauerbrey-Fall noch der Kanazawa-Gordon-Fall gerecht. Deswegen wird zur Analyse der Biofilme der Akustische-Multilayer-Formalismus herangezogen.

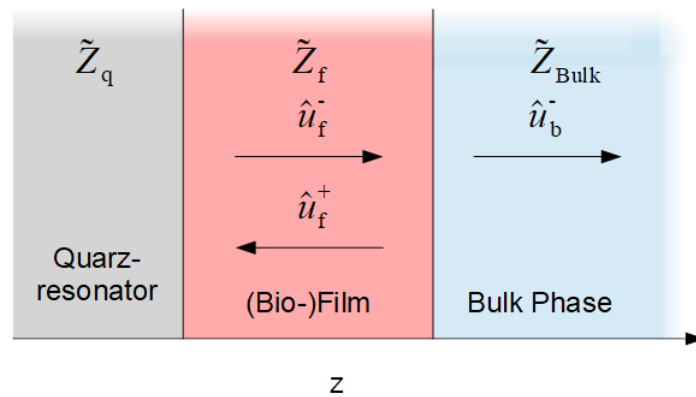


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Akustischen-Multilayer-Formalismus.

### 3. Theorie

Das grundsätzliche Prinzip ist in Abbildung 14 dargestellt. Der Quarzresonator sendet in  $z$ -Richtung eine akustische Scherwelle mit der Auslenkung  $\hat{u}_f^-$  aus. Beim Übergang aus dem Film in die Bulk-Phase wird die Scherwelle teilweise in Richtung des Quarzresonators reflektiert ( $\hat{u}_f^+$ ), während der andere Teil ( $\hat{u}_b^-$ ) weiter in der Bulk-Phase propagiert. Aus der Auswertung von  $\hat{u}_f$  an der Quarzoberfläche folgt Gleichung (15):<sup>[69]</sup>

$$\frac{\tilde{f}}{f_0} = \frac{-\tilde{Z}_f \tilde{Z}_f \tan(\tilde{k}_f d_f) - i\tilde{Z}_{liq}}{\pi Z_q \tilde{Z}_f + i\tilde{Z}_{liq} \tan(\tilde{k}_f d_f)} \quad (15)$$

$\tilde{k}_f$  ist der komplexe Wellenvektor,  $\tilde{Z}_f$  bzw.  $\tilde{Z}_{liq}$  sind die akustischen Impedanzen des Films bzw. der Lösung. Durch einen Fit von Gleichung (15) an die gemessene Bandbreiten- und Frequenzverschiebungen sind die Dicke des Films  $d_f$  und die viskoelastischen Eigenschaften  $G'$  und  $G''$  des Films zugänglich. Bei der Anpassung von mehreren Obertönen muss noch beachtet werden, dass  $\tilde{G}$  eine Funktion der Frequenz ist. Oftmals kann diese Abhängigkeit durch ein Potenzgesetz beschrieben werden:<sup>[70]</sup>

$$G'(f) \approx G'(f_{ref}) \left( \frac{f}{f_{ref}} \right)^{\beta'} \quad (16)$$

$$G''(f) \approx G''(f_{ref}) \left( \frac{f}{f_{ref}} \right)^{\beta''} \quad (17)$$

$f_{ref}$  beschreibt in diesem Fall eine beliebige Referenzfrequenz innerhalb des untersuchten Frequenzbereiches. Der Exponent  $\beta'$  liegt in einem Bereich zwischen 0 und 2,  $\beta''$  liegt in einem Bereich zwischen  $-1$  und  $1$ .



## 3.2.8 Filmresonanz

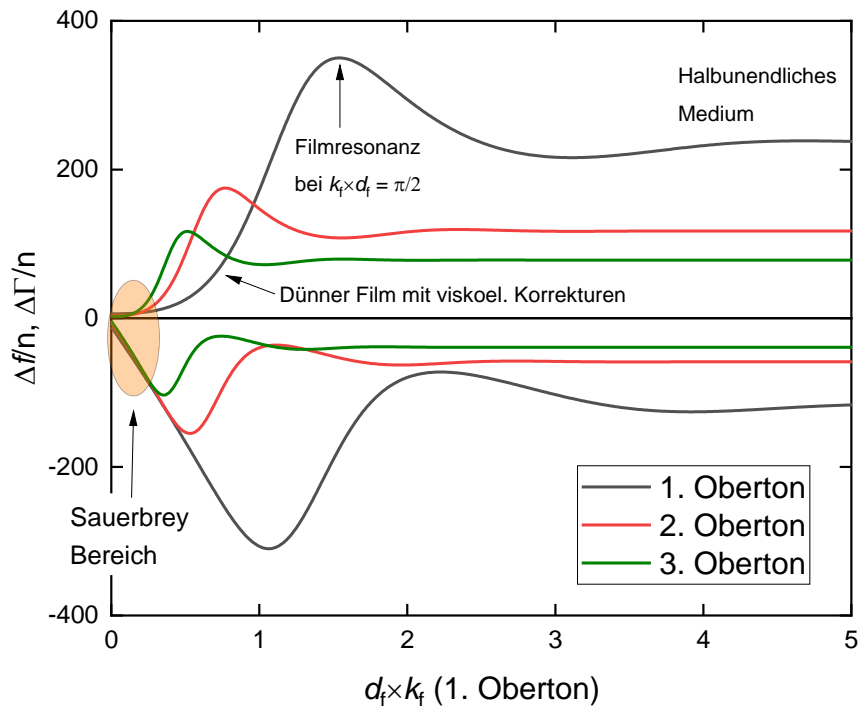


Abbildung 15: Nach Gleichung (15) berechneter Kurvenverlauf der Frequenz- und Bandbreitenverschiebung für einen viskoelastischen Film mit variabler Dicke in einer Flüssigkeit.

Abbildung 15 zeigt den nach Gleichung (15) berechneten Verlauf der Frequenz- und Bandbreitenverschiebung für einen viskoelastischen Film mit der Dicke  $d_f$ . In der Anfangsphase befindet sich der Sauerbrey-Grenzfall. In diesem Bereich ist, wie erwartet,  $\Delta f/n = \text{const}$  und  $\Delta \Gamma \approx 0$ . Im nachfolgenden Bereich beginnt die Bandbreite anzusteigen. In diesem Bereich ist der Film immer noch dünn, aber es müssen bereits viskoelastische Korrekturen vorgenommen werden. Bei  $k_f d_f = 1$  erreicht die Frequenzverschiebung ihr Minimum und wird danach wieder positiver. Die Bandbreitenverschiebung steigt weiter an bis auch sie bei  $k_f d_f = \pi/2$  ein Maximum durchläuft. Dies ist die Filmresonanz. Die Filmdicke entspricht in diesem Bereich einem Viertel der Wellenlänge der Scherwelle. Nach Durchlaufen der Filmresonanz nimmt die Bandbreitenverschiebung wieder ab. Danach können die Frequenz- und Bandbreitenverschiebung weitere Minima/Maxima durchlaufen, die jedoch zunehmend schwächer ausgeprägt sind. Für  $d_f \rightarrow \infty$  nähern sich die Verschiebungen konstanten Werten an. Der Film wirkt wie ein halbunendliches, viskoelastisches Medium.

### 3. Theorie

Die Obertöne zeigen qualitativ den gleichen Verlauf. Allerdings ist ihr Wellenvektor  $k_f$  aufgrund der höheren Resonanzfrequenz kleiner. Dadurch wird die Filmresonanz bei kleineren Dicken erreicht.

#### 3.2.9 Dämpfender Kontakt

Ein weiteres eher selten auftretendes Modell ist der dämpfende Kontakt. Das mechanische Modell hierzu ist ein einzelner Dämpfer an einer schweren Masse (siehe Abbildung 16).

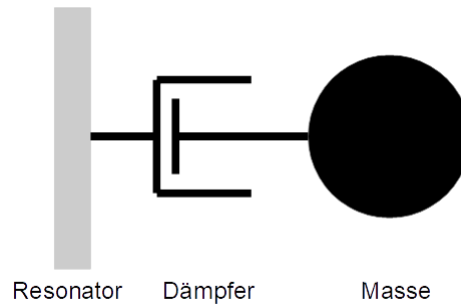


Abbildung 16: Mechanisches Modell eines einfachen Dämpfers an einer schweren Masse, die durch ihre Trägheit festgehalten wird.

Die Masse ist so schwer, dass sie kaum mitschwingt und in der Berechnung vernachlässigt werden kann. Dadurch reduziert sich die Berechnung der Lastimpedanz in diesem Modell auf den Beitrag der Dämpfungskonstante  $\xi$  und der Oberfläche  $A$ :

$$\tilde{Z}_L = \frac{\xi}{A} \quad (18)$$

Aus dem Einsetzen in die Small Load Approximation folgt:

$$\Delta\Gamma = \frac{f_0}{\pi Z_Q} \frac{\xi}{A} \quad (19)$$

Wie Gleichung (19) zeigt, kommt es in einem solchen Fall nur zu einer Bandbreitenverschiebung, die auf allen Obertönen konstant (proportional zu  $n^0$ ) ist, während die Resonanzfrequenz unverändert bleibt.

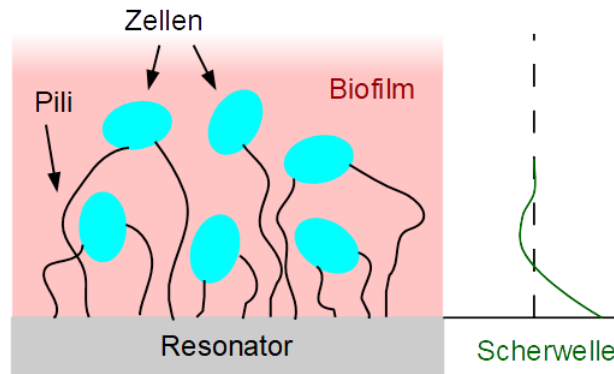


Abbildung 17: Die Zelle nutzen Pili sowohl zur Anhaftung an die Oberfläche als auch zum Ladungstransport. Die Scherwelle des Dicken-Scher-Resonators dringt nicht tief in den Biofilm ein. Es werden hauptsächlich die Pili detektiert. Diese erhöhen durch ihre Schwingung in der Lösung die Energiedissipation des Systems.

Im Kontext des Biofilmwachstums kann ein solches Verhalten auftreten, wenn die Eindringtiefe der Scherwelle kleiner ist als typische Biofilmkomponenten. Für Resonatoren mit Fundamentalfrequenzen im MHz-Bereich liegt die Eindringtiefe der Scherwelle in Wasser bei nur einigen hundert Nanometern. Zellen von *Geobacter sulfurreducens* haben hingegen eine Größe vom 1–2  $\mu\text{m}$ .<sup>[71]</sup> Die Verbindung der Zellen mit der Oberfläche erfolgt über Pili, die sowohl leitfähig sind (siehe Kap. 2.2.2) als auch der Verankerung der Zellen dienen. Diese Strukturen werden von dem Resonator erfasst und führen zu dem beschriebenen Verhalten, wenn sie von dem Resonator in Schwingung versetzt werden. Deswegen wird im Rahmen dieser Arbeit die Pili-effizienz  $J$  als die Ableitung der Bandbreitenverschiebung  $\Delta\Gamma$  gegen die Stromdichte  $j$  definiert:

$$J = \frac{d \Delta\Gamma}{dj} \quad (20)$$

Die Pili-effizienz gibt an, wie hoch die Pili Dichte sein muss, um eine bestimmte Stromdichte erreichen zu können. Ist  $J$  konstant, spricht dies für die Pilitheorie, da aus einer höheren Pili-dichte eine proportional größere Stromdichte resultiert.

### 3.3 Torsions-Resonatoren

Standardmäßig werden Dicken-Scher-Resonatoren mit Fundamentalfrequenzen im MHz-Bereich als Schwingquarz-Mikrowaage verwendet. Durch die hohe Frequenz sind diese Resonatoren sehr empfindlich, sodass Massen im Nanogramm-Bereich messbar sind. Diese Genauigkeit hat aber auch ihren Preis. Aufgrund der hohen Frequenz ist die Eindringtiefe der Scherwelle in ein Medium nicht besonders groß. Bei Wasser liegt sie nur im Bereich einiger hundert Nanometer.<sup>[70]</sup> Für die Untersuchung dickerer Filme werden Resonatoren mit einer

### 3. Theorie

deutlich geringeren Fundamentalfrequenz benötigt. Die Verringerung der Fundamentalfrequenz ist auch für Dicken-Scher-Resonatoren möglich, indem die Dicke der Quarzplatte erhöht wird. Allerdings müsste in diesem Fall auch der Durchmesser im vergleichbaren Maßstab ansteigen, was zu sehr großen und teuren Resonatoren führen würde. Ein deutlich einfacherer Ansatz ist die Verwendung von Torsions-Resonatoren statt Dicken-Scher-Resonatoren.<sup>[7]</sup>

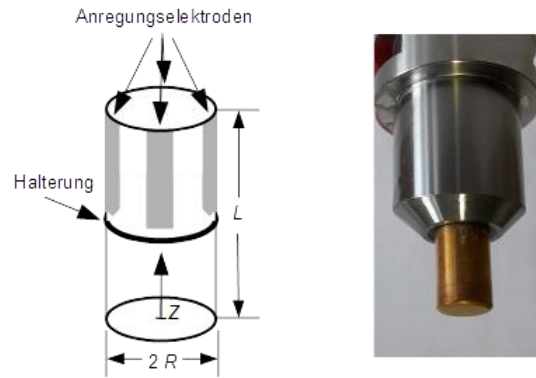


Abbildung 18: Links: Schematischer Aufbau eines Torsions-Resonators. Rechts: Foto eines mit Gold beschichteten Torsions-Resonators.

Ein solcher Resonator ist in Abbildung 18 dargestellt. Das Kernelement dieses Resonators ist ein Quarz-Zylinder. Die Einspannung in den Halter erfolgt an der Mitte seiner Mantelseite. Der obere Teil des Zylinders wird komplett durch den Halter bedeckt. Hier sind auch die vier Anregungselektroden für die Schwingungsanregung aufgebracht. Diese versetzen den Resonator in eine Torsions-Schwingung, deren Resonanzfrequenz typischerweise im kHz-Bereich liegt. Im Gegensatz zu Dicken-Scher-Resonatoren können beim Torsions-Resonator nicht nur die ungeraden, sondern auch die geraden Obertöne angeregt werden.

Der untere Teil des Resonators liegt frei und kann für Messungen verwendet werden. Hier erkennt man einen weiteren Vorteil des Torsions-Resonators gegenüber dem Dicken-Scher-Resonator: Beim Dicken-Scher-Resonator hat zwangsläufig eine Anregungselektrode Kontakt zur Probe. Ist diese Elektrode nicht gut geerdet, können elektrische Störsignale auftreten. Beim Torsions-Resonator sind die Anregungselektroden hingegen komplett von der Probe isoliert. Es kann auf dem blanken Quarz oder einer beliebig modifizierten Oberfläche gearbeitet werden.

Für die Auswertung können die in Kap. 3.1 beschriebenen Gesetzmäßigkeiten verwendet werden, wenn  $Z_Q$  entsprechend Gleichung (16) modifiziert wird:

$$Z_Q = \frac{2M_Q f_0}{A} \quad (21)$$

$M_q$  ist die Masse des Quarzzylinders,  $A$  ist die Oberfläche des Torsions-Resonators. Für die in dieser Arbeit verwendeten Torsions-Resonatoren liegt der Wert des nach Gleichung (21) modifizierten  $Z_q$  bei  $1.52 \times 10^6 \text{ kg}/(\text{m}^2 \text{ s})$ .<sup>[71]</sup>

### 3.3.1 Flächenabhängigkeit

Die Empfindlichkeit des Torsions-Resonators ist nicht über die komplette Oberfläche konstant. Stattdessen ist sie proportional zum Quadrat der Auslenkung  $u$  an der betreffenden Stelle. An der Mantelseite wird die Auslenkung durch einen Kosinus beschrieben:

$$u_M(z) = u_{\max} \cos\left(\frac{n\pi z}{L_Z}\right) \quad (22)$$

$L_Z$  ist die Länge des Zylinders,  $z$  ist die  $z$ -Position (Die Stirnfläche ist bei  $z = 0$ , siehe Abbildung 18). An der Stirnfläche skaliert die Auslenkung an der radialen Position  $r$  mit dem Radius  $R_Z$  des Zylinders.

$$u_F(r) = \frac{r}{R_Z} u_{\max} \quad (23)$$

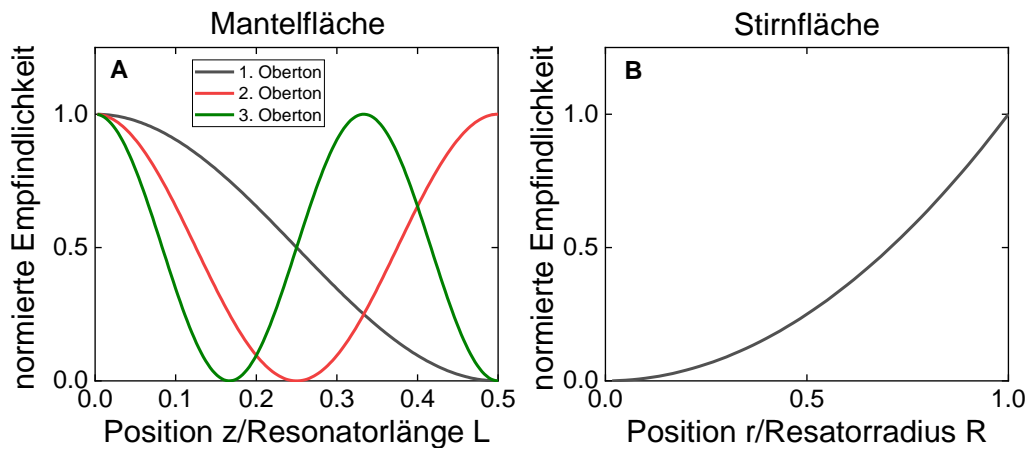


Abbildung 19: Normierte Empfindlichkeit des Torsions-Resonators an verschiedenen Positionen der Mantelfläche (A) und der Stirnfläche (B). Bei A gibt es zusätzlich eine Obertonabhängigkeit. Bei B ist die Empfindlichkeit unabhängig von der Obertonordnung.

Abbildung 19 zeigt die normierte Empfindlichkeit  $u/u_{\max}$  der Mantelfläche (A) und der Stirnseite (B). Die empfindlichste Stelle des Torsions-Resonators ist der Zylinderrand. Komplet unempfindlich ist er an der Knotenlinie, die durch die Mitte der Stirnfläche geht, sowie an den Knotenebenen, die durch die Nullstellen des Kosinus aus Gleichung (22) gegeben sind. Erfolgt die Bedeckung des Torsions-Resonators mit einer Beladung nicht gleichmäßig, kann  $\Delta\tilde{f}$  durch die Anwendung von Gleichung (24) berechnet werden.<sup>[7]</sup>

### 3. Theorie

$$\Delta\tilde{f} = \frac{i}{2\pi M_Q} \left[ \int_{\text{Stirn}} \frac{u^2(r)}{\langle u^2 \rangle} \tilde{Z}_{L,f}(r) dA + \int_{\text{Mantel}} \frac{u^2(z)}{\langle u^2 \rangle} \tilde{Z}_{L,s}(z) dA \right] \quad (24)$$

Erfolgt die Bedeckung gleichmäßig von der Stirnseite bis zu einer Position  $z$ , kann Gleichung (24) zu Gleichung (25) vereinfacht werden.

$$\Delta\tilde{f} = \frac{i\tilde{Z}_L}{2\pi M_Q} \left( \pi R_Z^2 + 2\pi R_Z z + R_Z L_Z \sin\left(\frac{2z\pi}{L_Z}\right) \right) \quad (25)$$

Aufgrund dieser Flächenabhängigkeit können im Sauerbrey-Fall aus der Obertonabhängigkeit eines Filmes Aussagen über die Gleichmäßigkeit des Filmes getroffen werden. Ist diese Abhängigkeit wie vom Sauerbrey-Fall erwartet proportional zur Obertonordnung  $n$ , dann ist dies ein sehr guter Hinweis, dass der Film gleichmäßig auf dem Resonator verteilt ist. Wäre der Film nicht gleichmäßig verteilt, würden sich aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Obertöne unterschiedliche Frequenzverschiebungen einstellen.

#### 3.3.2 Piezoelektrische Versteifung

Ein Effekt, der speziell beim Torsions-Resonatoren Beachtung finden muss, ist die piezoelektrische Versteifung. Die Ladungen, die durch die piezoelektrische Anregung des Torsions-Resonators entstehen, bilden einen Kondensator, dessen Feldlinien sich sowohl im Quarz, in der Halterung als auch in der Probe ausbreiten.<sup>[72]</sup> Dieser Kondensator stellt einen Beitrag zur Gesamtimpedanz des Resonators. Ändert sich durch eine Probe die Kapazität des Kondensators, verschiebt sich die Resonanzfrequenz des Resonators, wie durch Gleichung (26) beschrieben.<sup>[73]</sup>

$$\Delta\tilde{f}_{PS} = \frac{4f_0 k_t^2}{\pi^2 n} \left[ \left( 1 + \frac{\tilde{Y}_{ex}^*}{i\omega C_0} \right)^{-1} - \left( 1 + \frac{\tilde{Y}_{ex,Ref}^*}{i\omega C_0} \right)^{-1} \right] \quad (26)$$

$k_t$  ist der piezoelektrische Kopplungskoeffizient. Er lässt sich über die mechanische Kapazität  $C_1$  berechnen:

$$k_t^2 = \frac{8}{(n\pi)^2} \frac{C_1}{C_0} \quad (27)$$

$\tilde{Y}_{ex}$  ist die effektive Admittanz der Probe. Diese hat mit  $i\varepsilon_0 \varepsilon l \omega$  einen kapazitiven und mit  $\kappa l$  einen Leitfähigkeitsanteil. Der Referenzzustand  $\tilde{Y}_{ex,Ref}$  ist der Resonator in Luft.  $l$  ist ein geometrischer Faktor.

$$\tilde{Y}_{ex} = i\varepsilon_0 \varepsilon l \omega + \kappa l \quad (28)$$

$$\tilde{Y}_{\text{ex,Ref}} = i\varepsilon_0 \varepsilon_{\text{Luft}} l \omega \approx i\varepsilon_0 l \omega \quad (29)$$

Die Leitfähigkeit  $\kappa$  ist für viele Lösungsmittel klein und kann vernachlässigt werden. Dann folgt aus der Kombination von Gleichung (26) mit Gleichung (28) und (29):

$$\Delta f_{\text{PS}} = \frac{4C_0 \varepsilon_0 (1 - \varepsilon) f_0 k_t^2 l}{(C_0 + \varepsilon_0 l)(C_0 + \varepsilon_0 \varepsilon l) \pi^2 n} \quad (30)$$

Wie Gleichung (30) zeigt, wirkt sich der Effekt der piezoelektrischen Versteifung primär auf die Frequenzverschiebung aus. Die Bandbreite wird nur schwach beeinflusst (eine hohe Leitfähigkeit verstärkt den Effekt auf die Bandbreite). Durch das Aufbringen einer leitfähigen Schicht auf die Resonatoroberfläche kann der Effekt der piezoelektrischen Versteifung deutlich reduziert werden.

### 3.4 Elektrochemie

#### 3.4.1 Elektrodenpotential und Nernst Gleichung

Findet an einer Elektrode eine Redoxreaktion statt, dann verändert die Reaktion den Polarisationszustand der Elektrode. Wenn die Reduktion genauso schnell wie die Oxidation ist, dann befindet sich das System im Gleichgewicht. In diesem Fall kann mit der Nernst-Gleichung das Potential der Elektrode  $E$  in einer Halbzelle in Abhängigkeit von den Aktivitäten der reduzierten und der oxidierten Spezies  $a_{\text{Red}}$  und  $a_{\text{Ox}}$  berechnet werden.

$$E = E^0 - \frac{RT}{z_e F} \ln \frac{a_{\text{Red}}}{a_{\text{Ox}}} \quad (31)$$

$E^0$  ist das Standardelektrodenpotential,  $R$  ist die allgemeine Gaskonstante,  $T$  die Temperatur,  $z_e$  die Anzahl der ausgetauschten Elektronen und  $F$  ist die Faraday-Konstante. Mit der allgemeinen Nernst-Gleichung (32) kann die Gleichgewichtszellspannung  $\Delta E$  einer elektrochemischen Zelle berechnet werden:

$$\Delta E = \Delta E^0 - \frac{RT}{z_e F} \ln \prod_{i=1}^k a_i^{v_i} \quad (32)$$

$\Delta E^0$  ist das Standardelektrodenpotential,  $a_i$  die Aktivität und  $v_i$  ist der stöchiometrische Koeffizient der Komponente  $i$ . Eine Reaktion läuft immer in der Richtung ab, für die  $\Delta E$  größer als 0 V ist.

### 3. Theorie

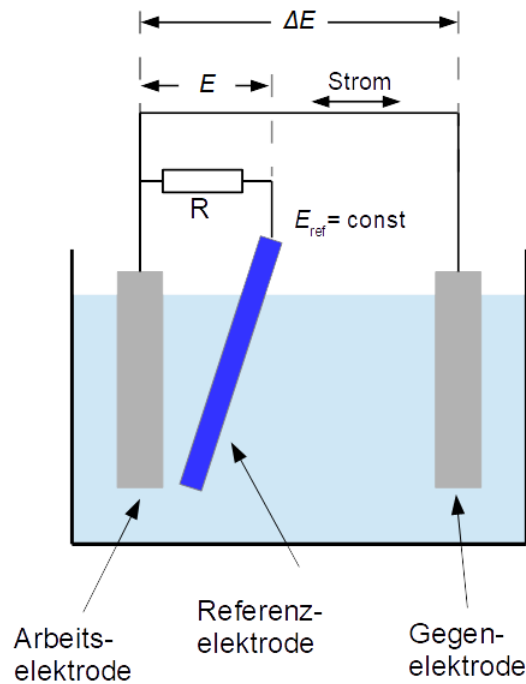


Abbildung 20: Aufbau einer elektrochemischen Zelle mit Potentialkontrolle.

Abbildung 20 zeigt den Aufbau einer elektrochemischen Zelle mit einer Drei-Elektroden-Anordnung. Die dritte Elektrode ist notwendig, weil die direkte Messung eines Elektrodenpotentials nicht möglich ist. Messtechnisch zugänglich sind Spannungen, also Potentialdifferenzen. Daher wird für die Bestimmung des Elektrodenpotentials eine Referenzelektrode mit konstantem und bekanntem Potential benötigt. Das Potential der Gegenelektrode ist als Referenz ungeeignet, weil es sich durch den Stromfluss ändern kann. Aufgrund der hohen Austauschstromdichte von Wasserstoff an Platin hat sich die Standardwasserstoffelektrode (SHE,  $H_2$  an Pt,  $a(H^+) = 1$ ,  $p = 1013 \text{ hPa}$ ) als gängiger Standard etabliert. Da die praktische Umsetzung dieser Elektrode experimentell aufwendig ist, finden bei elektrochemischen Messungen häufig Referenzelektroden zweiter Art Verwendung. Bei diesen steht das potentialbestimmende Ion im Gleichgewicht mit einem schwerlöslichen Salz. Die Konzentration des Gegenions wird durch Zugabe eines leichtlöslichen Salzes konstant gehalten, wodurch auch die Konzentration des potentialbestimmenden Ions und folglich auch das Potential der Elektrode konstant bleibt.

In dieser Arbeit wurde immer eine gesättigte Kalomelektrode (SCE,  $E = 0.244 \text{ V}$  gg. SHE) als Referenz verwendet. Alle Potentialangaben in dieser Arbeit beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf die SCE als Referenz.



### 3.4.2 Buttler-Volmer-Gleichung

Die Buttler-Volmer-Gleichung stellt einen Zusammenhang zwischen der Stromdichte  $j$  und der angelegten Überspannung  $\eta$  her:<sup>[74]</sup>

$$j = j_0 \left[ \frac{c_O}{c_O^*} \exp\left(\frac{\alpha z_e F \eta}{RT}\right) - \frac{c_R}{c_R^*} \exp\left(\frac{-(1 - \alpha) z_e F \eta}{RT}\right) \right] \quad (33)$$

$j_0$  ist die Austauschstromdichte,  $z_e$  ist die Anzahl der ausgetauschten Elektronen,  $F$  ist die Faraday-Konstante,  $R$  die allgemeine Gaskonstante und  $T$  ist die Temperatur.  $c_O$  bzw.  $c_R$  sind die Konzentrationen des Oxidationsmittels bzw. des Reduktionsmittels an der Elektrodenoberfläche,  $c_O^*$  bzw.  $c_R^*$  sind die Konzentrationen des Oxidationsmittels bzw. des Reduktionsmittels in der Bulk-Phase.  $\alpha$  ist der Ladungstransferkoeffizient. Entspricht die Konzentration der Ionen der Bulk-Phase der Konzentration der Ionen an der Elektrodenoberfläche, dann vereinfacht sich Gleichung (33) zu:

$$j = j_0 \left[ \exp\left(\alpha \frac{z_e F \eta}{RT}\right) - \exp\left(-(1 - \alpha) \frac{z_e F \eta}{RT}\right) \right] \quad (34)$$

Gleichung (33) und (34) lassen sich nur anwenden, wenn der Strom durch den Ladungsaustausch an der Elektrode begrenzt wird. Ist hingegen der Stofftransport limitierend, findet Gleichung (35) Anwendung:

$$j = \frac{z_e F D_{\text{eff}}}{d_{\text{Nernst}}} c^* \quad (35)$$

$D_{\text{eff}}$  ist der effektive Diffusionskoeffizient und  $d_{\text{Nernst}}$  ist die Dicke der Nernst-Schicht.  $c^*$  ist die Bulk-Konzentration des betreffenden Ions. In diesem Fall ist die Stromdichte unabhängig von der Überspannung.

Ist das elektrochemische System im Gleichgewicht und die Überspannung klein, dann kann die Austauschstromdichte  $j_0$  aus dem Charge-Transfer-Widerstand bestimmt werden:

$$R_{\text{CT}} \approx \frac{RT}{z_e F j_0} \quad (36)$$

Der Charge-Transfer-Widerstand  $R_{\text{CT}}$  ist z.B. über Impedanzmessungen zugänglich.

### 3. Theorie

#### 3.4.3 Faraday Effizienz

Nach dem Faraday'schen Gesetz ist bei einer elektrochemischen Abscheidung die Masse  $m$  des abgeschiedenen Materials proportional zur geflossenen Ladung  $Q$ :

$$m = \frac{M}{z_e F} Q \quad (37)$$

$M$  ist die molare Masse des abgeschiedenen Materials,  $F$  ist die Faraday-Konstante (96485.33 C/mol), und  $z_e$  ist die Anzahl der ausgetauschten Ladungen. Unter der Annahme, dass die Biofilmmasse  $m$  proportional zur Biofilmdicke  $d_F$  ist, kann eine Faraday-Effizienz  $H$  berechnet werden:

$$H = \frac{dm_F}{dQ} \propto \frac{dd_F}{dQ} \quad (38)$$

Die Faraday-Effizienz gibt an, wie viel Biofilm mit einer bestimmten Ladungsmenge aufgebaut werden kann. Aufgrund des komplexen Mechanismus, der hinter dem Biofilmaufbau steckt, ist  $H$  ein empirischer Parameter. Für einen normalen Faraday Prozess ist die Faraday-Effizienz konstant. Eine Betrachtung der Faraday-Effizienz bei elektrochemisch aktiven Biofilmen gibt Aufschluss über die Energieverteilung der Bakterien. Die Ladungsmenge entspricht einer Energiemenge, die den Zellen zur Verfügung steht. Nimmt die Faraday-Effizienz zu, dann investieren die Zellen mehr Energie in den Aufbau des Biofilms, nimmt sie ab sind für die Zellen andere Prozesse wichtiger.<sup>[54]</sup>

#### 3.4.4 Strom Effizienz

Die Leistung eines elektrochemisch aktiven Biofilms hängt von der elektrischen Leistung aller im Biofilm vorhanden Zellen ab. Die Anzahl der Zellen ist in etwa proportional zur Biofilmdicke. Die Stromeffizienz  $P$  berechnet sich aus der Stromdichte  $j$  und der Biofilmdicke  $d_f$ :

$$P = \frac{dj}{dd_f} \quad (39)$$

Die Stromeffizienz gibt an, wie viel Strom ein Volumenelement des Biofilms produziert. Eine Betrachtung der Stromeffizienz gibt Aufschluss über die Leistungsfähigkeit der Bakterien und Transporthemmnisse im Biofilm. Ist die Stromdichte proportional zur Biofilmdicke ( $P(d) = \text{const}$ ), dann bedeutet dies, dass jede neue Zelle noch ihr volles Stoffwechsel-Potential ausschöpfen kann. Ist hingegen die Stromdichte unabhängig von der Biofilmdicke ( $P(d) = 0$ ), dann tragen neue Zellen nicht mehr zur Stromproduktion bei. In diesem Fall sind Transportprozesse strombegrenzend (siehe Abbildung 5).

## 4 Experimentelles

### 4.1 Anzucht elektrochemisch aktiver Biofilme

Die Biofilme wurden grundsätzlich unter Potentialkontrolle in einem abgeschlossenen Einkammeraufbau angezogen (siehe Abbildung 21). Der Grund dafür ist die Reaktion an der Gegenelektrode. Hier kann unter den Versuchsbedingungen entweder die Sauerstoffreduktion oder die Wasserstoffreduktion stattfinden. Die Sauerstoffreduktion würde zwar freiwillig ablaufen, kann aber nicht in einem Einkammersystem durchgeführt werden, da *Geobacter sulfurreducens* streng anaerob ist. Ein Zweikammersystem mit trennender Membran wäre in diesem Fall notwendig.

Auf der anderen Seite stellt Wasserstoff für den Biofilm kein Problem dar. Allerdings reicht das Potential der Gegenelektrode nicht aus, um die Wasserstoffreduktion freiwillig ablaufen zu lassen ( $E^0(\text{H}^+/\text{H}_2, \text{pH} = 7) = -654 \text{ mV vs. SCE}$ ,  $E^0(\text{CO}_2/\text{Acetat}, \text{pH} = 7) = -0.521 \text{ mV vs. SCE}$ ).<sup>[38]</sup> Daher kann in einem Einkammersystem nur unter Potentialkontrolle gearbeitet werden.

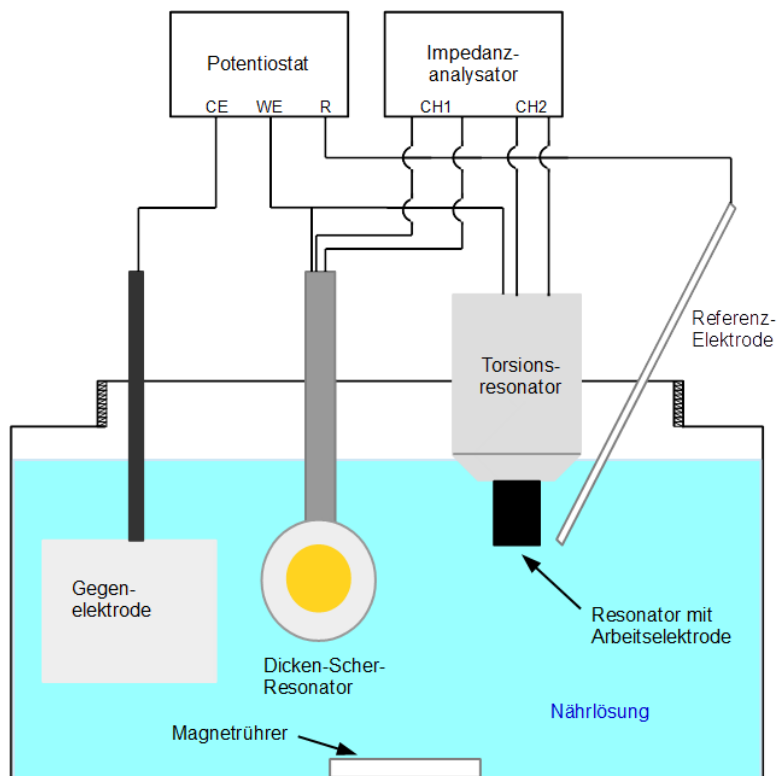


Abbildung 21: Schematischer Versuchsaufbau.

Alle Experimente wurden entweder in einem 600 mL Behälter aus Plexiglas oder in einem 1.1 L großen Glasreaktor durchgeführt. Der 600 mL Behälter bietet Platz für einen Torsions-

## 4. Experimentelles

Resonator (siehe Kap. 4.2.1), ein Stahlblech (2×3 cm) als Gegenelektrode und eine Referenzelektrode (KE11, Kalomelelektrode, ges. KCl, 244 mV vs. SHE, Sensortechnik Meinsberg GmbH). Der 1.1 L Behälter enthält zusätzlich noch einen Halter für einen Dicken-Scher-Resonator (siehe Kap. 4.2.2) sowie eine zweite Gegenelektrode. Alle Experimente fanden in einem abgedunkelten Kasten statt, damit es zu keiner Algenbildung in den Reaktoren kommen konnte. Mit einem Heizlüfter kann der Kasten auf 35 °C temperiert werden. Oftmals wurde aber auch bei Raumtemperatur (20–30 °C) gearbeitet.

Die Nährlösung wird wie in Abschnitt 4.6 beschrieben hergestellt. Die Nährlösung wird vor Gebrauch für mindestens eine halbe Stunde mit Stickstoff gespült. Dann wird sie in das Wachstumsgefäß eingefüllt, welches danach luftdicht verschlossen wird. Dies ist bereits im Vorfeld mit den Resonatoren (vgl. Abschnitt 4.2), der Referenzelektrode und der Gegenelektrode (Stahlblech, 6 cm<sup>2</sup>) versehen worden. Anschließend wird der Aufbau sowohl mit dem Impedanzanalysator als auch mit dem Potentiostaten elektrisch verbunden. Mit dem Potentiostaten wird an den Schwingresonator(en) als Arbeitselektrode(n) ein konstantes Potential von –241 mV (gg. SCE) angelegt. Nachdem sich das Signal der QCM stabilisiert hatte (i.d.R. nach einem Tag), wurde die Nährlösung mit einem Inokulum (siehe Kap. 4.4) angeimpft.

## 4.2 Verwendete Schwingquarze

In dieser Arbeit fanden zwei Arten von Quarzresonatoren Anwendung. Die meisten Messungen wurden mit Torsions-Resonatoren durchgeführt. Diese sind mit ihrer Resonanzfrequenz im kHz-Bereich geeignet, Biofilme in Gänze zu untersuchen. Ergänzend wurden auch Experimente mit Dicken-Scher-Resonatoren durchgeführt. Mit einer Resonanzfrequenz im MHz-Bereich sind Dicken-Scher-Resonatoren deutlich empfindlicher als Torsions-Resonatoren. Diese Empfindlichkeit geht aber auf Kosten der Eindringtiefe, sodass sich Dicken-Scher-Resonatoren besonders gut für die Untersuchung der initialen Phase des Wachstums sowie elektrodennahe Veränderungen im ausgewachsenen Biofilm eignen.

### 4.2.1 Torsions-Resonatoren

In dieser Arbeit wurde als Torsions-Resonator der Messkopf QVMoEL (mit Masseschirm) des Quarzviskosimeters QVis (flucon fluid control GmbH) benutzt. Dieser Torsions-Resonator besteht aus einem Quarzzylinder (Länge: 35 mm, Durchmesser: 12 mm, Gewicht: 10.4 g). Die Anregung der Torsions-Schwingung erfolgt durch vier an der Oberseite befindliche Elektroden. Die Grundfrequenz dieser Schwingung liegt bei 56 kHz. Die komplette obere Hälfte (inklusive der Anregungselektroden) des Quarzkristalles ist in einem Halter eingefasst. Die untere, frei

zugängliche Hälfte, ist mit einem Einbrennlack auf Silberbasis beschichtet, welcher als Elektrode für die elektrochemischen Experimente dient. Außerdem wird durch den Lack der Effekt der piezoelektrischen Versteifung (siehe Kap. 3.3.2) reduziert. Da dieser Lack gegenüber den Biofilmen keine dauerhafte Stabilität besaß, wurde zusätzlich noch ein Graphit-Lack (siehe Kap. 4.4) aufgetragen. Dafür wurde der Einbrennlack mit Wasser und Aceton vorsichtig gereinigt. Anschließend wurde der leitfähige Graphit-Lack mit einem Pinsel aufgetragen. Bei Bedarf wurde die Beschichtung erneuert.

Die so erhaltene Elektrode diente als Arbeitselektrode für die Anzucht des elektrochemisch aktiven Biofilms. Das Anlegen des Potentials erfolgte über das Gehäuse des Quarzhalters, weil es unweigerlich eine elektrische Verbindung zwischen Elektrode und Gehäuse gibt. Daher wurden alle Teile des Gehäuses mit einem Klarlack (Aerosol Klarlack glanz, Peter Kwasny GmbH) bestrichen, um sie von der Umgebung elektrisch zu isolieren, sodass keine störenden elektrochemischen Reaktionen an der Gehäuseoberfläche stattfinden können.

Die Anregung des Resonators erfolgte auf drei verschiedenen Obertönen: Der erste Oberton liegt bei einer Resonanzfrequenz von 56 kHz, der zweite bei einer Resonanzfrequenz von 112 kHz und der dritte bei einer Resonanzfrequenz von 168 kHz. Dass auch der zweite Oberton zugänglich ist, ist überraschend, weil dieser ein Auslenkungsmaximum (vgl. Kap. 3.3.1) an der Halterung hat. Anscheinend ist die Auslenkung so klein und das Halterungsmaterial so weich, dass eine Schwingung immer noch möglich ist.

Der erste Oberton hat sich als besonders zuverlässig erwiesen. Seine Temperaturabhängigkeit ist mit 0.125 Hz/K nur schwach ausgeprägt. Der Resonanzpeak in Luft ist mit einer Bandbreite von nur wenigen Hz scharf. Der zweite und dritte Oberton sind unzuverlässiger und stärker verrauscht. Ihre Resonanzen sind deutlich breiter als die Resonanz des Grundtons und liegen bei einigen hundert Hz in Luft. Dadurch ist auch das Rauschen auf dem zweiten und dritten Oberton größer als auf dem ersten.

### 4.2.2 Dicken-Scher-Resonatoren

Die Dicken-Scher-Resonatoren (QCM5254CrAu128-064-M, Quartz Pro AB) bestehen aus einer runden Quarz-Platte (AT-Schnitt) mit einem Durchmesser von 25.4 mm und einer Dicke von 332  $\mu\text{m}$ . Sowohl auf der Oberseite als auch auf der Unterseite sind die Anregungselektroden aufgedampft. Sie bestehen aus Gold über einer Chrom-Haftschrift. Die Fundamentalfrequenz der Dickenschers-Schwingung liegt bei 5 MHz.

## 4. Experimentelles

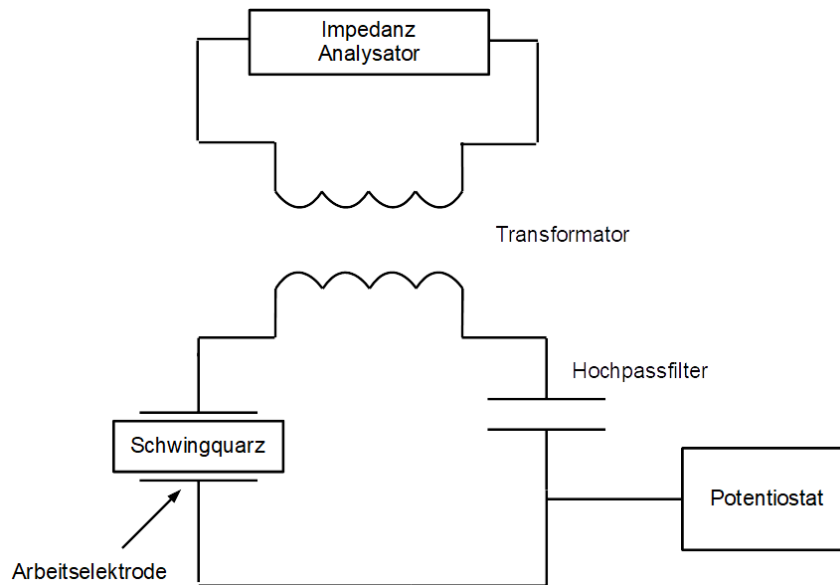


Abbildung 22: Schaltplan für einen Dicken-Scher-Resonator mit angeschlossenem Potentiostaten.

Die obere Anregungselektrode wurde bei elektrochemischen Messungen als Arbeitselektrode benutzt. Dafür muss sie vom Signal des Impedanzanalysators getrennt werden. Dies geschah mit der in Abbildung 22 dargestellten Schaltung. Der Impedanzanalysator wird über einen Transformator an das System gekoppelt. Auf diese Art wird das Potential der Arbeitselektrode vom Potential des Impedanzanalysators getrennt und kann mit dem Potentiostaten eingestellt werden. Ein Hochpassfilter verhindert, dass das DC-Signal des Potentiostaten auch an die Rückelektrode des Quarzes übertragen wird. Der Einbau eines Tiefpassfilters zum Potentiostaten ist nicht notwendig, weil das AC Signal von internen Filtern im Potentiostaten herausgefiltert wird.

In der Regel wurde auf sechs Obertönen gemessen (5 MHz, 15 MHz, 25 MHz, 35 MHz, 45 MHz, 55 MHz). Zur Auswertung wurden der 3., 5. und 7. Oberton herangezogen.

## 4.3 Datenaufnahme und Auswertung

### 4.3.1 Datenerfassung

Die Schwingquarze werden mit Impedanzanalysatoren (Agilent E5100A für den Torsions-Resonator und Dicken-Scher-Resonator, N2PK-VNA für den Dicken-Scher-Resonator) betrieben. Die Aufnahme mit dem E5100A erfolgt mit einer elektrischen Anregungsleistung von 10 dBm und einer IF Bandwidth von 10 Hz für den Torsions-Resonator bzw. mit einer Leistung von 2 dBm und einer IF Bandwidth von 300 Hz für Dicken-Scher-Resonator. Beim N2PK-VNA kann die elektrische Anregungsleistung nicht verändert werden und liegt bei ca. 6 dBm.

Die Regelung der Aufnahmegeschwindigkeit erfolgt über die ADC-Speed, welche auf einen Wert von 6 eingestellt wird. Mit beiden Impedanzanalysatoren werden je 101 Messpunkte pro Resonanzkurve aufgenommen. Die Datenaufnahme erfolgt mit dem Programm QTZ: Für jeden Oberton wird ein Impedanzsweep im Bereich der Resonanzfrequenz durchgeführt. Die Breite des Messfensters wird auf das fünffache der Bandbreite festgesetzt.

Dadurch erhält man eine Resonanzkurve sowohl für die Konduktanz  $G$  als auch für die Suszeptanz  $B$ . An diese Kurven wird eine Lorentz-Funktion (Gleichung (40) und (41)) angepasst, welche die Resonanzfrequenz  $f_{\text{Res}}$  und die Bandbreite  $\Gamma$  (definiert als halbe Breite auf halber Höhe des Maximums, siehe Kap. 3.2.2) als wesentliche Parameter enthält:

$$G_{\text{Fit}} = G_{\text{max}} \left[ \frac{f^2 (2\Gamma)^2}{(f_{\text{Res}}^2 - f^2)^2 + (2\Gamma)^2 f^2} \cos\varphi - \frac{(f_{\text{R}}^2 - f^2) f (2\Gamma)}{(f_{\text{Res}}^2 - f^2)^2 + (2\Gamma)^2 f^2} \sin\varphi \right] + G_{\text{Off}} \quad (40)$$

$$+ G_{\text{Slo}} (f - f_{\text{Res}})$$

$$B_{\text{Fit}} = G_{\text{max}} \left[ -\frac{f^2 (2\Gamma)^2}{(f_{\text{Res}}^2 - f^2)^2 + (2\Gamma)^2 f^2} \sin\varphi - \frac{(f_{\text{R}}^2 - f^2) f (2\Gamma)}{(f_{\text{Res}}^2 - f^2)^2 + (2\Gamma)^2 f^2} \cos\varphi \right] \quad (41)$$

$$+ B_{\text{Off}} + B_{\text{Slo}} (f - f_{\text{Res}})$$

Um die Anpassung möglichst robust zu halten, wird ebenfalls ein Offset  $B_{\text{Off}}$  und  $G_{\text{Off}}$ , ein Phasenwinkel  $\varphi$ , und eine lineare Steigung  $G_{\text{Slo}}$  und  $B_{\text{Slo}}$  mit in die Formel einbezogen. Dadurch wird zwar die Unsicherheit der Bandbreite und der Resonanzfrequenz erhöht. Diese wird aber durch die bessere Qualität der Anpassung mehr als kompensiert.

Das Programm speichert die Resonanzfrequenz und die Bandbreite ab. Ausgegeben wird die Frequenz- bzw. Bandbreitenverschiebung relativ zu einem Referenzzustand. Als Referenzzustand wurde, sofern nicht anders angegeben, der Resonator in der Nährlösung zum Zeitpunkt der Inokulation gewählt.

#### 4.3.2 Datenauswertung mittels QTM

Die Auswertung der Frequenz- und Bandbreitenverschiebungen erfolgt mit dem Programm QTM.<sup>[75]</sup> Dieses Programm modelliert den Biofilm basierend auf den in Kap. 3.2.7 dargelegten Gleichungen. Als Modell wird der „Acoustic Multilayer Formalism“ mit einem einzelnen Film und einer Bulk-Phase gewählt. Für die Bulk-Phase (Nährlösung) wird eine Dichte von 0.997 g/cm<sup>3</sup> und eine Viskosität von 0.89 mPas angenommen. Die Filmdichte wird mit 1 g/cm<sup>3</sup> approximiert. Etwas problematisch ist die Wahl der Exponenten der Potenzgesetze. Nach Ausprobieren verschiedener Werte wurde  $\beta'$  wie auch  $\beta''$  auf einen Wert von 0.5 festgelegt.

## 4. Experimentelles

Angepasst werden jeweils die Biofilmdicke, der Betrag des Schermoduls  $|\tilde{G}|$  als ein Maß für die Biofilmsteifigkeit und der Verlustfaktor. Die Anpassung erfolgt über die Minimierung der Fehlerquadratsumme mittels eines Simplex-Algorithmus. Als Referenzfrequenz für die Anpassung wurde 100 kHz gewählt.

Trotz der vielen Annahmen erwies sich die Biofilmdicke als robuster Parameter. In vielen Fällen, besonders in der Anfangsphase, ist die Abweichung vom Sauerbrey-Verhalten klein. In diesem Bereich können die Sauerbrey-Gleichung und der Multilayer Formalismus für die Berechnung der Dicke gleichermaßen verwendet werden. Die Anwendung der Sauerbrey-Gleichung ist vor allem während der Initiierungsphase sinnvoll, weil der Fit bei dünnen Biofilmen aufgrund der kleinen Frequenz- und Bandbreitenverschiebungen noch unzuverlässig ist.

Problematischer ist die Anpassung des Schermoduls. Der Wert des Schermoduls  $|\tilde{G}|$  zeigt eine starke Abhängigkeit von den Exponenten  $\beta'$  und  $\beta''$ , sodass der Absolutwert keine hohe Signifikanz besitzt. Allerdings waren die Trends in der Entwicklung weitgehend unabhängig von den gewählten Werten der Exponenten, sodass der qualitative Verlauf zuverlässig ist. Weiterhin muss beachtet werden, dass die Parameter für eine Frequenz von 100 kHz bestimmt worden sind.

Der Verlustfaktor ist vor allem im Anfangsstadium wenig verlässlich, weil es sich beim Verlustfaktor um den Quotienten aus  $G''$  und  $G'$  handelt. Dieser ist so lange stark fehlerbehaftet, wie  $G'$  und  $G''$  noch sehr klein sind, wie es in der Anfangsphase der Fall ist.

### 4.4 Herstellung des Graphit-Lacks

Der Graphit-Lack wird zur Beschichtung des Torsions-Resonators benötigt, weil der Silberlack von den Bakterien angegriffen und mit der Zeit aufgelöst wird. Zuerst wurde eine Polymer-Stammlösung hergestellt, indem ein Tischtennisball aus Zelluloid in 50 mL Butanon aufgelöst worden war. Zur Herstellung des Lackes wurden 1 g der Polymer-Stammlösung mit 1 g einer alkoholischen Graphit-Suspension (CP-Spez.20-0-2, CP-Graphitprodukte GmbH) vermischt. Anschließend wurde die Suspension mit 0.5 g Butanon aufgefüllt und gut durchmischt.<sup>[76]</sup>

Der Lack wurde mit einem Pinsel auf den Resonator aufgetragen und für mindestens einen Tag bei Raumtemperatur an Luft getrocknet.



## 4.5 Herstellung des Inokulums

Um als Quelle für ein Inokulum zu dienen, wurde dauerhaft ein Biofilm einer Abwasser-Kultur von *Geobacter sulfurreducens* gezüchtet. Diese Bakterienkultur stammt aus dem Arbeitskreis Schröder (IÖNC, TU Braunschweig) und wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ursprünglich wurde diese Kultur vom Arbeitskreis Schröder aus Abwasser der Kläranlage Steinhof in Braunschweig herangezüchtet. Im Abwasser ist *Geobacter sulfurreducens* natürlicherweise vorhanden. Allerdings ist sein Anteil so gering, dass er nicht direkt nachgewiesen werden kann. Durch die speziellen Anzuchtbedingungen (siehe Kap. 4.1) kann *Geobacter sulfurreducens* Biofilme ausbilden und sich so anreichern. Dies ist möglich, weil Acetat von elektrochemisch inaktiven Bakterien unter anaeroben Bedingungen nicht verarbeitet werden kann.

Dieser primäre Biofilm kann wieder als Inokulum für einen sekundären Biofilm benutzt werden. Aufgrund der höheren Konzentration an *Geobacter sulfurreducens* im Inokulum unterscheidet sich das Anwachsverhalten des sekundären Biofilms von dem des primären Biofilms. Dieses Verfahren kann nun wiederholt werden, um einen tertiären Biofilm zu erhalten. Dieser kann noch leichte Abweichungen im Vergleich zum sekundären Biofilm zeigen. Ab dem tertiären Biofilm ist dann das Wachstumsverhalten aller weiteren Biofilme gleich. Es werden deswegen alle dieser Filme als „tertiäre Biofilme“ bezeichnet.

Der tertiäre Biofilm wächst in einem Dreihalskolben in einem Standardmedium auf zylindrischen Graphitelektroden bei einem Potential von 160 mV gg. SCE an. Zur Herstellung eines Inokulums für einen neuen Biofilm wurde ein Teil dieses Biofilms mit einem Spatel abgekratzt, in ca. 15 mL des Phosphatpuffers gegeben und durch schütteln dispergiert. Diese Bakteriendispersion konnte daraufhin als Inokulum zeitnah verwendet werden.

## 4.6 Herstellung der Nährlösung

Die Nährlösung dient als Wachstumsmedium für die Biofilme. Sofern nicht anders angegeben, wurde die hier beschriebene Nährlösung benutzt. Als Grundlage diente eine Phosphat-Pufferlösung (pH = 7, siehe Kap. 4.6.1). Auf einen Liter dieser Pufferlösung wurden 12.5 mL der Mineralien-Stammlösung (siehe Kap. 4.6.2) und 12.5 mL der Vitamin-Stammlösung (siehe Kap. 4.6.3) gegeben.<sup>[77]</sup> Als Kohlenstoffquelle dienten 840 mg (10 mM) Acetat (99 %, Sigma-Aldrich).

## 4. Experimentelles

### 4.6.1 Herstellung des Phosphatpuffers

Als Grundlage für die Nährlösung dient ein Phosphat-Puffer (pH = 7). Die Pufferlösung soll den pH-Wert der Lösung konstant halten, um pH-Effekte ausschließen zu können. Der Puffer bestand aus 2.69 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (pro analysi, Merck), 4.33 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (for cell culture, Sigma-Aldrich), 0.31 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (99.5 %, Sigma-Aldrich) und 0.13 g/L  $\text{KCl}$  (99 %, Sigma-Aldrich), gelöst in Wasser (Reinstwasser, ARIUM®611VF, Sartorius,  $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ).

### 4.6.2 Herstellung der Mineralien-Stammlösung

Um die Bakterien in der Nährlösung mit Mineralien versorgen zu können, wurde eine Stammlösung eines Mineralien-Gemisches hergestellt:

Zur Herstellung der Mineralien-Stammlösung wurden zunächst 1.5 g/L Nitrilotriessigsäure (99 %, Alfa Aesar) in Wasser (Reinstwasser, ARIUM®611VF, Sartorius,  $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ) gelöst. Danach wurde mit KOH (p.a., 85 %) und ggf. HCl der pH-Wert auf 6.5 eingestellt. Anschließend wurden die folgenden Salze gelöst: 3 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (purum p.a., 99 %, Fluka), 0.45 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (for cell culture, Sigma-Aldrich), 1.0 g/L  $\text{NaCl}$  (99 %), 0.1 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (99 %, Merck), 0.183 g/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (purum p.a., 99 %, Fluka), 0.075 g/L  $\text{CaCl}_2$  (99 %, Sigma-Aldrich), 0.178 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (pro analysi, Merck), 0.01 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (chem. Pure, Riedel-De Haen AG), 0.01 g/L  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  (98 %, Alfa Aesar), 0.01 g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (99 %, Merck). Die Lagerung der Mineralien-Stammlösung erfolgte im Kühlschrank.

### 4.6.3 Herstellung der Vitamin-Stammlösung

Die Vitaminlösung versorgt die Bakterien mit essentiellen Vitaminen. Für die Versuche wurde eine Stammlösung hergestellt:

Die Vitamin-Stammlösung wurde hergestellt, indem 2.0 mg/L Biotin (98 %, TCI), 2.0 mg/L Folsäure (Cell Culture Reagent, Alfa Aesar), 10.0 mg/L Pyridoxinhydrochlorid (99 %, Alfa Aesar), 5.0 mg/L Thiaminhydrochlorid (99 %, Sigma-Aldrich), 5.0 mg/L Riboflavin (98 %, from *Eremothecium ashbyii*, Sigma-Aldrich), 5.0 mg/L Nikotinsäure (99 %, TCI), 5.0 mg/L *DL*-Calciumpantothenat (99 %, Sigma-Aldrich), 0.1 mg/L Vitamin B12 (98 %, Sigma-Aldrich), 5.0 mg/L *p*-Aminobenzoessäure (99 %, TCI), 5.0 mg/L Liponsäure (99 %, Sigma-Aldrich) in Wasser (Reinstwasser, ARIUM®611VF, Sartorius,  $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ) gelöst wurden. Die Vitamin-Stammlösung wurde im Kühlschrank gelagert.

## 5 Ergebnisse und Auswertung

### 5.1 Vorversuche

In diesem Abschnitt werden einige Vorversuche gezeigt, die im Rahmen meiner Masterarbeit durchgeführt wurden, die die Funktionsfähigkeit des Torsions-Resonators und die Gültigkeit der Gleichungen aus Kap. 3.2 und 3.3 überprüfen.<sup>[78]</sup> Dafür werden einfache Beispiele für den Sauerbrey-Fall und den Kanazawa-Gordon Fall untersucht. Des Weiteren wird auf den Effekt der piezoelektrischen Versteifung eingegangen.

#### 5.1.1 Flächenabhängigkeit und Auswertung mit Kanazawa-Gordon-Relation

Viskositätsmessungen sind für Torsions-Resonatoren bekannt.<sup>[79]</sup> Der in dieser Arbeit verwendete Torsions-Resonator wurde ursprünglich für Viskositätsmessungen von der Firma flucon fluid control GmbH entwickelt. Zur Berechnung der Viskosität benutzen diese jedoch empirische Kalibrationskurven.<sup>[80]</sup> Stattdessen wird in diesem Abschnitt die Abhängigkeit der Bandbreitenverschiebung von der Viskosität mit der Kanazawa-Gordon-Gleichung untersucht. Dabei wird gleichzeitig auch die Abhängigkeit von der Eintauchtiefe betrachtet.

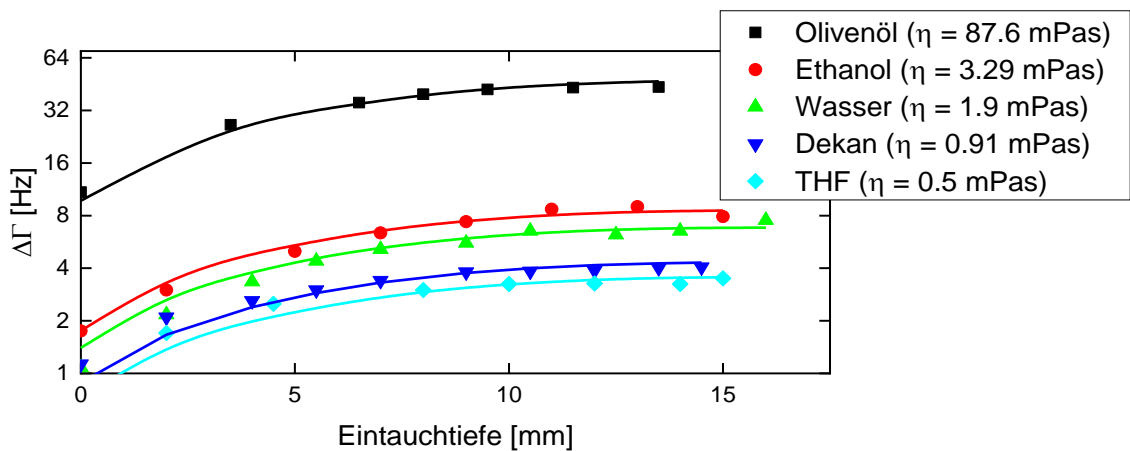


Abbildung 23: Bandbreitenverschiebung in Abhängigkeit von der Eintauchtiefen für verschiedene Flüssigkeiten. Bei  $z = 0$  ist die Stirnfläche bereits in Berührung mit dem Wasser ( $\rightarrow \Delta\Gamma(0 \text{ cm}) \neq 0$ ). Die Daten wurden im Rahmen meiner Masterarbeit erhoben.<sup>[78]</sup> Die Kurven stellen den Fit mit den angegebenen Viskositäten als Fitparameter dar.

Abbildung 23 zeigt die Bandbreitenverschiebung auf dem ersten Oberton in Abhängigkeit von der Eintauchtiefe in Flüssigkeiten mit verschiedenen Viskositäten. Für die reine Messung von Viskositäten hat sich der erste Oberton als besonders verlässlich erwiesen. Bei  $z = 0$  ist die Stirnseite bereits eingetaucht, der Mantel aber noch nicht. Der Anteil der Stirnfläche an der Gesamtempfindlichkeit liegt bei 20 %.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

An die Datenpunkte wurde mit Gleichung (10) und (25) die Viskosität angepasst (siehe Legende). Für Olivenöl, Dekan und THF stimmen die ermittelten Viskositäten gut mit den Erwartungswerten aus der Literatur überein.<sup>[81–83]</sup> Die Abweichung liegt bei weniger als 10 %. Bei Wasser und Ethanol stimmt noch die Größenordnung der Viskosität. Der exakte Wert weicht jedoch um mehr als 100 % vom Literaturwert ab.<sup>[84]</sup> Diese Abweichung lässt sich auf die piezoelektrische Versteifung zurückführen (vgl. Kap. 3.3.2). Beide Stoffe haben eine hohe relative Permittivität (Wasser:  $\epsilon = 80.1$ , Ethanol:  $\epsilon = 25.3$ ) und eine gewisse Restleitfähigkeit. Dadurch sind bei ihnen die Effekte der piezoelektrischen Versteifung besonders stark ausgeprägt.

### 5.1.2 Sauerbrey und Filmresonanz

Biofilme sollten idealerweise in ihrem Verhalten nicht zu weit entfernt vom Sauerbrey-Verhalten liegen, sodass Änderungen in der Dicke verfolgt werden können. Um das Verhalten des Torsions-Resonators im Sauerbrey-Fall untersuchen zu können, wurde ein definierter Film auf dem Torsions-Resonator aufgebracht und vermessen.

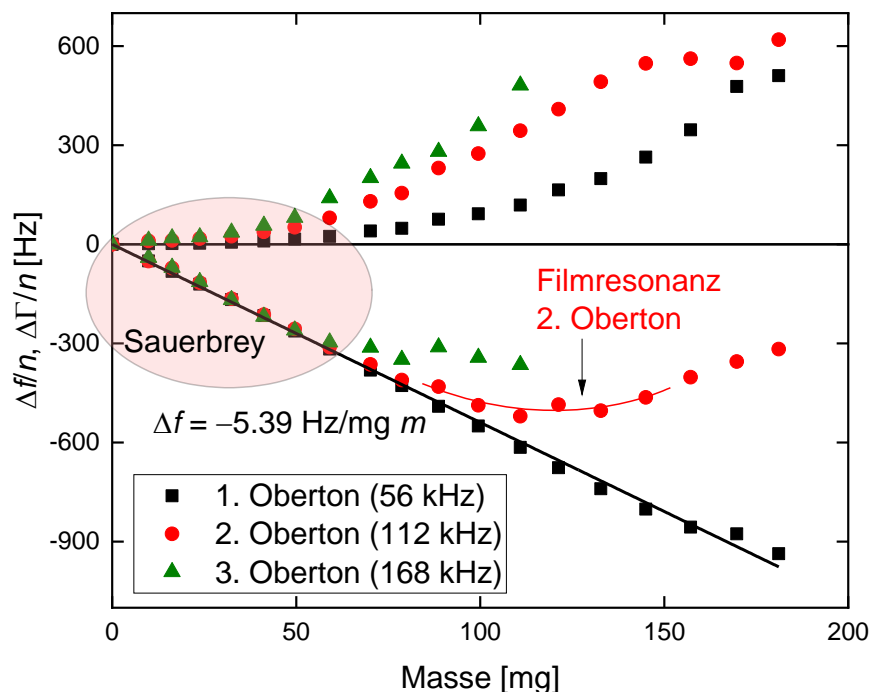


Abbildung 24: Tesafilmstreifen mit einem definierten Gewicht auf einem Torsions-Resonator.

Abbildung 24 zeigt das Signal eines Torsions-Resonators, der sukzessive mit Tesafilm (Polypropylen mit Kleber) beklebt worden ist. Die Gewichte der Tesafilmstreifen wurden gravimetrisch bestimmt. Da nur ein Teil des Resonators beklebt werden konnte (die Breite des Tesafilms beträgt 1.5 cm), wurden die Frequenzverschiebungen unter Anwendung von Gleichung (25) korrigiert. Bis zu einer Filmmasse von 60 mg ist das Verhalten für alle Obertöne Sauerbrey-artig. Die Frequenzverschiebungen sind proportional zur Obertonordnung. Die Steigung entspricht mit 5.39 Hz/mg dem erwarteten Wert (5.38 Hz/mg). Die Bandbreitenverschiebung ist näherungsweise null.

Oberhalb einer Beladung von 60 mg beginnen die Bandbreiten des 2. und 3. Obertons anzusteigen und der Betrag der Steigung der Frequenzverschiebung wird kleiner. In diesem Bereich erreichen die Obertöne ihre Filmresonanz (vgl. Kap. 3.2.8). Da die Wellenlänge der Scherwelle für den dritten Oberton am kleinsten ist (vgl. Gleichung (14)), erreicht dieser seine Filmresonanz zuerst. Ab diesem Zeitpunkt kann der dritte Oberton nicht weiter vermessen werden, weil die Fitroutine bei diesen Resonanzkurven versagt. Der 2. Oberton kann auch nach Erreichen der Filmresonanz noch weiter vermessen werden. In diesem Bereich sinkt der Betrag der Frequenzverschiebung, wenn die Massenbeladung steigt. Danach folgt ein langsamer Übergang in den Kanazawa-Gordon Bereich.

Der erste Oberton erreicht im Messbereich seine Filmresonanz nicht. Das Verhalten der Frequenzverschiebung ist auch bei hohen Beladungen noch in guter Näherung Sauerbrey-artig, auch wenn die Bandbreitenverschiebung bereits Werte in der Größenordnung von  $-\Delta f$  angenommen hat.

### 5.1.3 Piezoelektrische Versteifung

Wird ein unbeschichteter Torsions-Resonator in Wasser eingetaucht, sollten nach Kap. 3.2.5 der Betrag der Frequenzverschiebung gleich der Bandbreitenverschiebung sein. In der Realität ist die Frequenzverschiebung jedoch deutlich größer als die Bandbreitenverschiebung ( $\Delta\Gamma/(-\Delta f) \approx 0.15$ ). Diese Abweichung wird durch den Effekt der piezoelektrischen Versteifung (siehe Kap. 3.3.2) hervorgerufen. Durch das Eintauchen in das Wasser ändert sich die Kapazität des äußeren Kondensators so, dass die Resonanzfrequenz kleiner wird. Die Versuche zur Viskosität (siehe Kap. 5.1.1) sowie Berechnungen nach Gleichung (26) haben gezeigt, dass der Einfluss auf die Bandbreitenverschiebung zwar von der Leitfähigkeit des Lösemittels abhängig, aber i.d.R. klein ( $\ll 1$  Hz) ist. Daher kann die Summe aus Frequenz- und Bandbreitenverschiebung als Frequenzverschiebung der piezoelektrischen Versteifung  $\Delta f_{\text{PS}}$  verstanden werden:

## 5. Ergebnisse und Auswertung

$$\Delta f_{PS} = \Delta f + \Delta \Gamma \quad (42)$$

Abbildung 25 zeigt den Beitrag der piezoelektrischen Versteifung  $\Delta f_{PS}$  in Abhängigkeit von der relativen Permittivität für fünf verschiedene (Dekan:  $\epsilon = 2$ , Olivenöl:  $\epsilon = 2.5$ , THF:  $\epsilon = 7.58$ , Ethanol:  $\epsilon = 24.3$  und Wasser:  $\epsilon = 80$ ) Flüssigkeiten.

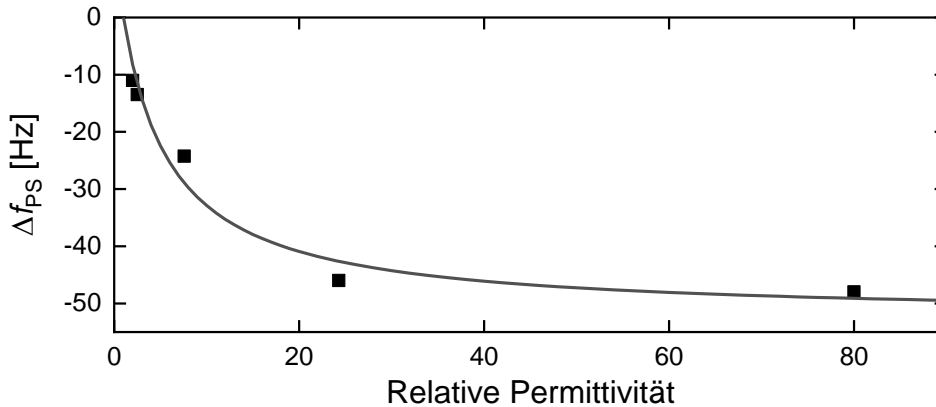


Abbildung 25: Abhängigkeit der Frequenzverschiebung, die durch die piezoelektrische Versteifung hervorgerufen wird, von der relativen Permittivität des Lösungsmittels für einen unbeschichteten Torsions-Resonator. Als Lösungsmittel dienten Dekan ( $\epsilon = 2$ ), Olivenöl ( $\epsilon = 2.5$ ), THF ( $\epsilon = 7.58$ ), Ethanol ( $\epsilon = 24.3$ ) und Wasser ( $\epsilon = 80$ ).

Gleichung (30) wird an die Daten in Abbildung 25 angepasst. Als Fitparameter dienen die Parallelkapazität  $C_0$ , der piezoelektrische Kopplungskoeffizient  $k_t^2$  und der Geometriefaktor  $l$ . Die Parallelkapazität kann zwar auch aus  $B_{\text{off}}$  aus Gleichung (41) berechnet werden, aber diese Bestimmung ist ungenau, weil sie auf eine sehr gute Kalibrierung (der Suszeptanz) angewiesen ist. Dies ist mit dem Torsions-Resonator schwierig, weil der Resonator fest im Halter befestigt ist, weswegen eine Kalibration des Halters nicht möglich ist.

Für  $k_t^2$  wurde ein Wert von 0.00284 angepasst. Die Parallelkapazität und der Geometriefaktor sind nicht orthogonal zueinander und zeigen eine lineare Abhängigkeit mit einer Steigung ( $\Delta l / \Delta C_0$ ) von 2.61 cm/pF. Dieser Quotient ist realistisch für beide Werte.

Durch das Aufbringen einer leitfähigen Schicht auf dem Resonator kann der Effekt der piezoelektrischen Versteifung deutlich reduziert werden.

### 5.2 Biofilmwachstum auf Quarzresonatoren mit Acetat

In diesem Kapitel wird das Biofilmwachstum unter idealen Voraussetzungen auf Quarzresonatoren beobachtet. Als Wachstumsmedium dient die in Kap. 4.6 beschriebene Nährlösung. Diese enthält sowohl Acetat als auch die Nährstoffe in mehr als ausreichender Menge. Das

Elektrodenpotential ist mit  $-240$  mV gg. SCE auch günstig für das Biofilmwachstum. Die Biofilme können frei von äußeren Zwängen wachsen. Das Wachstum wird sowohl mit Torsions-Resonatoren als auch mit Dicken-Scher-Resonatoren verfolgt.

### 5.2.1 Wachstum eines Biofilms auf einem Dicken-Scher-Resonator

Dicken-Scher-Resonatoren mit einer Fundamentalfrequenz im MHz-Bereich sind weit verbreitet und gut verstanden. Solche Quarze wurden auch schon für die Untersuchung von elektrochemisch aktiven Biofilmen benutzt. Allerdings beschränkten sich diese Untersuchungen häufig auf die Anfangsphase des Biofilmwachstums.<sup>[85–87]</sup>

In diesem Abschnitt wird ein kompletter Lebenszyklus eines Biofilms mit einem Dicken-Scher-Resonator verfolgt. Der Biofilm wächst nur auf der Au-Frontelektrode des Dicken-Scher-Resonators. Dickere Biofilme lassen sich auch optisch als rötlicher Belag auf dem Resonator erkennen.

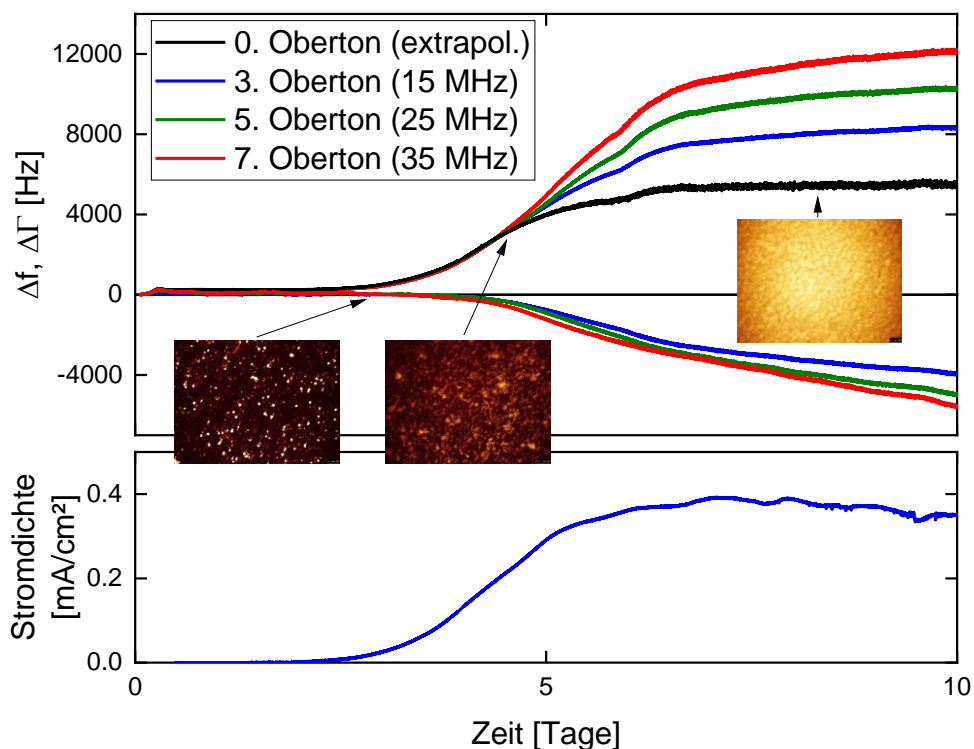


Abbildung 26: Wachstum eines Biofilms auf einem 5-MHz Dicken-Scher-Resonator. Die Bilder zeigen einen Ausschnitt der Größe  $1.3\text{ mm} \times 1.3\text{ mm}$  und stammen von vergleichbaren Biofilmen. Sie zeigen das Wachstum der Bakterienkolonien. Für die Aufnahme wurden die Bakterien mit DAPI angefärbt und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop abgebildet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte durch Kuangjie Liu im Rahmen seines Forschungspraktikums.<sup>[88]</sup>

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Abbildung 26 zeigt das Wachstum eines Biofilms auf einem Dicken-Scher-Resonator. Die eingefügten Bilder stammen von vergleichbaren Biofilmen, die von Kuangjie Liu im Rahmen seines Forschungspraktikums angezogen worden sind. Dafür wurde die Zellen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt und anschließend unter einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.<sup>[88]</sup> Auf ihnen ist zu sehen, dass der Biofilm zunächst einzelne, kleine verteilte Kolonien auf dem Resonator ausbildet. Diese Kolonien wachsen mit der Zeit, bis sie schließlich einen durchgehenden Biofilm ausbilden.

Die Stromdichte nimmt mit der Zeit zunächst zu und stabilisiert sich auf einem Niveau nahe 0.4 mA/cm<sup>2</sup>. Das Verhalten des Quarzes ist insofern interessant, als dass sich das Wachstum des Biofilms zu Beginn nur auf die Bandbreite auswirkt. In diesem Bereich ist die Bandbreitenverschiebung auf den verschiedenen Obertönen unabhängig von der Obertonordnung. Ein solches Verhalten kann in einem mechanischen Ersatzschaltbild durch einen Dämpfer erklärt werden, der mit der QCM verbunden ist (siehe Kap. 3.2.9). Ein Vergleich mit den Bildern zeigt, dass die Bandbreite steigt, wenn die Kolonien größer werden und damit auch die Anzahl der Zellen auf dem Resonator zunimmt.

Nach etwa fünf Tagen ändert sich dieses Verhalten. Die Resonanzfrequenz beginnt abzusinken und die Obertonabhängigkeit der Bandbreitenverschiebungen ändert sich, wodurch sich die Bandbreitenverschiebungen auffächern. In diesem Bereich ist die Oberfläche komplett mit Zellen bedeckt. Die Aufspaltung könnte daher von EPS kommen, die sich zwischen den Zellen immer weiter ansammeln und den Biofilm versteifen.

Nach dem sechsten Tag bleibt die Bandbreitenverschiebung konstant. Weil die Aufspaltung näherungsweise linear zur Obertonordnung  $n$  erfolgt, kann durch Extrapolation auf den nullten Oberton der Oberton-unabhängige Anteil berechnet werden:

$$\Delta\Gamma(n) = \Delta\Gamma_0 + \Delta\Gamma_n n \Rightarrow \Delta\Gamma_{\text{Korr.}} = \Delta\Gamma(n = 0) \quad (43)$$

Damit ergibt sich im Plateau für die Oberton-unabhängige maximale Bandbreitenverschiebung ein Wert von 5450 Hz. Gleichung (43) ist empirisch und folgt der Annahme, dass sich der Oberton-unabhängige Anteil und der Oberton-abhängige Anteil zueinander additiv Verhalten. Diese ist jedoch nicht zwingend aus der Theorie ableitbar.



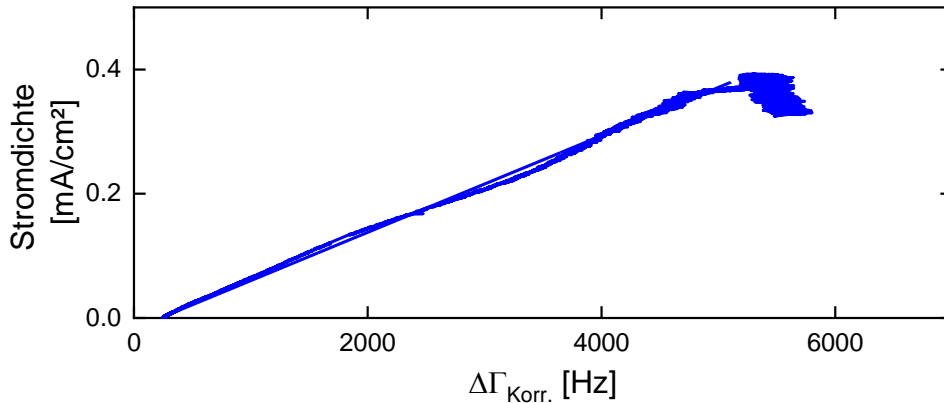


Abbildung 27: Zusammenhang zwischen der Stromdichte und der nach Gleichung (43) korrigierten Bandbreitenverschiebung für das Wachstum eines Biofilms auf einem Dicken-Scher-Resonator. Die Steigung entspricht der Piliereffizienz.

In Abbildung 27 ist die korrigierte Bandbreitenverschiebung gegen die Stromdichte aufgetragen. Die Abhängigkeit ist in guter Näherung linear. Die Piliereffizienz (=Steigung der Geraden) ist konstant. Dies spricht für die Annahme, dass der Oberton-unabhängigen Anteil der Bandbreitenverschiebung tatsächlich durch die leitfähigen Strukturelemente des Biofilms hervorgerufen wird. Für *Geobacter sulfurreducens* ist bekannt, dass die elektrische Leitfähigkeit seiner Biofilme im Wesentlichen durch Pili hervorgerufen wird.<sup>[89]</sup> Daher ist es wahrscheinlich, dass die Bandbreitenverschiebung durch die Pili verursacht wird.

### 5.2.2 Biofilmwachstum auf einem Torsions-Resonator

Es ist möglich, Biofilme von *Geobacter sulfurreducens* auf einem Torsions-Resonator wachsen zu lassen. Das Wachstum erfolgt gleichmäßig auf der Arbeitselektrode des Torsions-Resonators. Ist der Biofilm dick genug, kann er als rötlicher Belag auch optisch erkannt werden.

Abbildung 28 zeigt das Wachstum eines Biofilms auf einem Torsions-Resonator. Die Stromdichte, die Frequenz- und die Bandbreitenverschiebung werden gemessen. Die Dicke, der Betrag des Schubmoduls  $|\tilde{G}|$  und der Verlustfaktor ( $= G''/G'$ ) stammen aus der Anpassung des Multilayer Formalismus an die Verschiebungen (siehe Kap. 4.3.2). Das Wachstum des Biofilms lässt sich in drei verschiedene Abschnitte einteilen:

Im ersten Abschnitt, der Initialisierungsphase, zwischen null und zwei Tagen, adsorbieren einzelne Zellen an der Oberfläche und beginnen sich zu teilen und Extrazelluläre Polymere Substanzen zu bilden. Dieser Bereich umfasst die Adhäsions-, die Immobilisierungs- und die erste Reifungsphase. In diesem Bereich sind die angelagerten Massen noch klein, sodass sich

## 5. Ergebnisse und Auswertung

auch die Resonanzfrequenz und die Bandbreite des Torsions-Resonators nur geringfügig verändert. Die Stromdichte steigt mit einer Verdopplungszeit von 10 h bei einer Temperatur von 23 °C exponentiell an. Die Zellen können in diesem Bereich noch exponentiell wachsen, weil sie noch einen freien Zugang zur Anode haben. In diesem Bereich ist der Biofilm noch sehr weich ( $|\tilde{G}| < 10$  kPa).

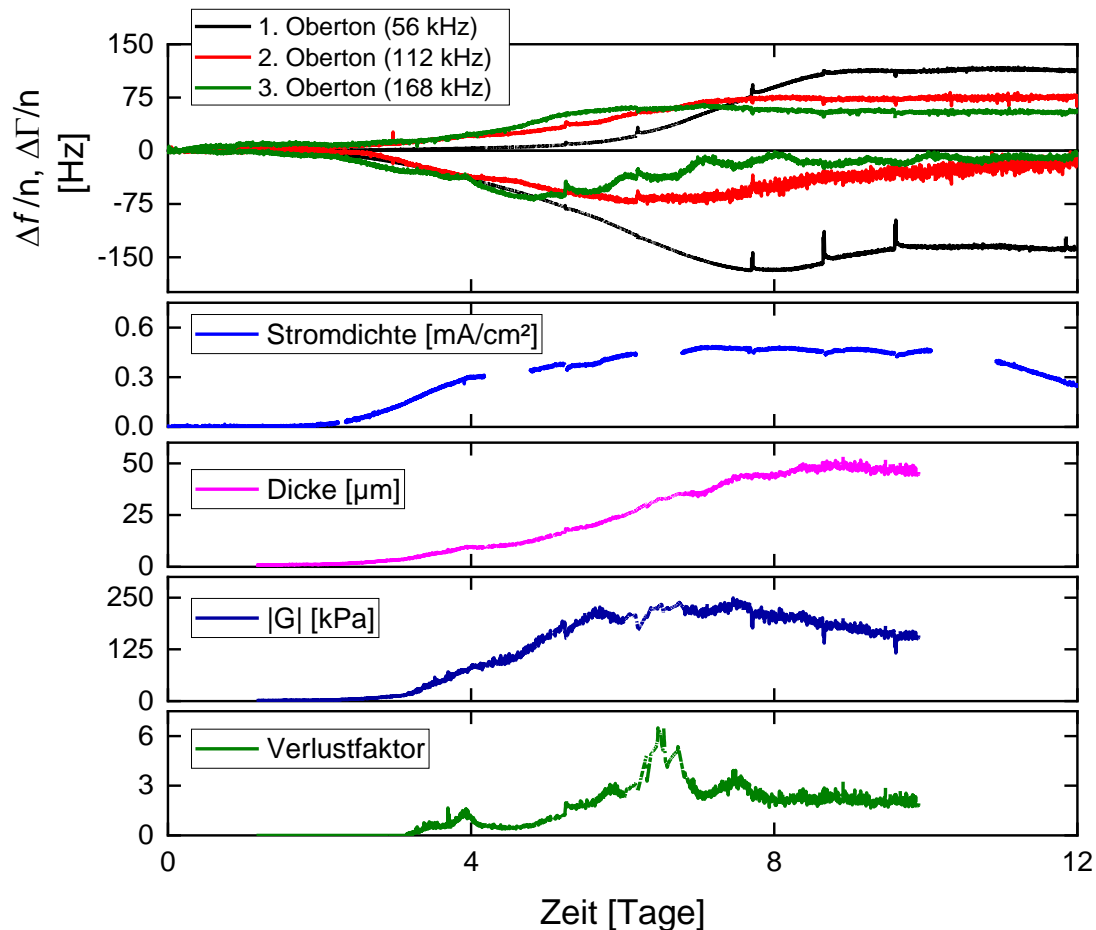


Abbildung 28: Biofilmwachstum auf einem Torsions-Resonator unter Normalbedingungen (Acetatkonzentration: 820 mg/L, Temperatur: 22.7 °C).

Im zweiten Abschnitt, der Wachstumsphase (Reifung I und II), zwischen drei und sieben Tagen kommt es zum Dickenwachstum des Biofilms. Die Resonanzfrequenz nimmt deutlich ab, während die Bandbreitenverschiebung klein bleibt. Dies ist ein typisches Sauerbrey-Verhalten. In diesem Bereich wächst der Biofilm in die Dicke, bleibt allerdings noch so dünn, dass die Scherwelle des Torsions-Resonators die Oberfläche noch erreicht. Das Wachstum erfolgt jedoch nicht gleichmäßig, wie fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Kuangjie Liu gezeigt haben.<sup>[90]</sup> Stattdessen kommt es zu einem Inselwachstum. Dabei gibt es Regionen mit hoher Zelldichte und damit auch großer Biofilmdicke, während in anderen Regionen die Zelldichte deutlich geringer ist. Diese Zellhaufen wachsen mit der Zeit sowohl in die Höhe als auch

in die Breite. Die Steifigkeit des Biofilms nimmt in diesem Bereich ebenfalls zu. Diese Versteifung kann auf die Ausbildung der EPS zurückgeführt werden. Es ist bekannt, dass eine Erhöhung der Konzentration von bestimmten EPS den Biofilm versteifen können.<sup>[91]</sup>

Mit der Zeit verbinden sich die einzelnen Zellhaufen und bilden einen Biofilm. Dieser besitzt noch immer eine Berg-Tal-Struktur. Die mit dem Torsions-Resonator bestimmte Dicke stellt einen Mittelwert der Biofilmdickenverteilung dar. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist in diesem Bereich näherungsweise linear und liegt bei 11  $\mu\text{m}/\text{Tag}$ .

Die Stromdichte nimmt in diesem Bereich ebenfalls zu, verbleibt jedoch ab einer Biofilmdicke von ca. 30  $\mu\text{m}$  auf einem Plateauwert von 0.47  $\text{mA}/\text{cm}^2$ . Später sinkt sie sogar wieder leicht ab. In diesem Bereich werden die Transportprozesse innerhalb des Biofilms geschwindigkeitsbestimmend (vgl. Kap. 2.1.4). Der Verlauf der Steifigkeit folgt in ihrem Verhalten der Stromdichte. Nachdem die Stromdichte ihr Maximum durchlaufen hat, fällt auch die Steifigkeit des Biofilms wieder etwas ab und der Film wird weicher. Die Kurvenverlauf der Steifigkeit ähnelt dem Verlauf der Bandbreitenverschiebung beim Dicken-Scher-Resonator (siehe Kap. 5.2.1). SUN *et al.* konnten nachweisen, dass es mit der Zeit zu einer Akkumulation an toten Zellen innerhalb des Biofilms kommt.<sup>[92]</sup> Diese toten Zellen können für den Rückgang der Steifigkeit verantwortlich sein.

Im letzten Abschnitt ab dem siebten Tag ist der Biofilm so stark gewachsen, dass es zu einer Filmresonanz kommt. Im Anschluss an diese erreicht die Scherwelle des Torsions-Resonators die Biofilmoberfläche nicht mehr. In diesem Bereich ist das Verhalten Kanazawa-Gordon-artig. Der Fit mittels des Multilayer-Formalismus ist in diesem Bereich nur noch schwer möglich und die Biofilmdicke verliert an Zuverlässigkeit.

Abbildung 29 A zeigt den Zusammenhang zwischen der Biofilmdicke und der Stromdichte. Die Steigung der Kurve ist die Stromeffizienz. Bis zu einer Biofilmdicke von 10  $\mu\text{m}$  ist die Stromeffizienz konstant und beträgt 480  $\mu\text{A}/\text{mm}^3$ . In diesem Bereich erreichen noch alle Zellen die Anode gleich gut, sodass jede Zelle die gleiche elektrische Leistung erbringt und der Strom proportional zur Zellenanzahl ist. Im Biofilmdickenbereich zwischen 10  $\mu\text{m}$  und 30  $\mu\text{m}$  geht die Stromdichte langsam in einen Plateauwert über. Die Stromeffizienz des Biofilms nimmt ab. Die neuen Bakterien können nicht mehr ihre volle elektrische Leistungsfähigkeit in die Stromproduktion einbringen. Ab einer Biofilmdicke von 30  $\mu\text{m}$  bleibt die Stromdichte näherungsweise konstant. In diesem Bereich führt das Biofilmwachstum zu keiner Leistungssteigerung mehr. Dieser Umstand ist ein Hinweis, dass der limitierende Faktor der Stromproduktion der Ladungstransport zur Elektrode ist (siehe Abbildung 5). Wäre der Stofftransport der Nähr- und

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Abfallstoffe geschwindigkeitsbestimmend, dann sollte die Stromdichte durch das weitere Biofilmwachstum abnehmen, weil der Diffusionsweg zur Bulk-Phase größer wird. Allerdings kann die Leitfähigkeit des Biofilms durch den pH-Wert beeinflusst werden, weswegen auch eine transportbedingte Änderung des pH-Werts zu einer Änderung der Leitfähigkeit führen kann.<sup>[93]</sup>

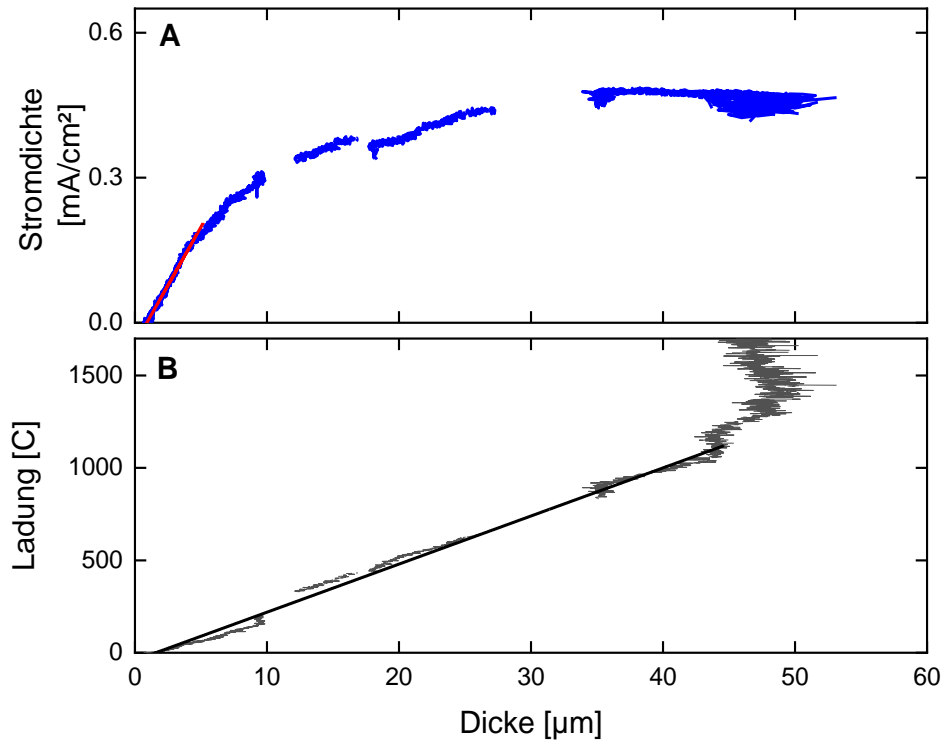


Abbildung 29: Zusammenhang zwischen der Biofilmdicke und der Stromdichte (A) bzw. der Ladung (B).

Abbildung 29 B zeigt die Abhängigkeit der Biofilmdicke von der Ladung. Die Steigung der Kurve ist die Faraday-Effizienz und beträgt  $27 \mu\text{g}/\text{C}$ . Das heißt, dass aus einem Gramm Acetat etwa 300 mg Biofilm gebildet werden. Wird für den Biofilm ein Feststoffgehalt von 10 % angenommen, dann ergibt dies, dass insgesamt 3 % des Acetats für den Biofilmaufbau benutzt werden.<sup>[94]</sup> Dies steht im Einklang mit den Messungen, die von TANG *et al.* durchgeführt wurden.<sup>[52]</sup> Bis zu einer Dicke von ca. 45  $\mu\text{m}$  bleibt der lineare Zusammenhang zwischen Ladung und Biofilmdicke bestehen. Dies zeigt, dass der Biofilmaufbau, trotz seiner komplizierten Natur, bis zu dieser Dicke in guter Näherung Faraday-artig erfolgt und mit einer normalen elektrochemischen Abscheidung vergleichbar ist.

Danach verlangsamt sich die Zunahme der Biofilmdicke. Allerdings ist in diesem Bereich die Dicke so groß, dass sie nur noch schlecht vom Torsions-Resonator erfasst werden kann.

Andererseits kann sich der Biofilm auch schon in seiner letzten Lebensphase befinden, in der er größere Mengen an Zellen an die Umgebung abgibt.

### 5.3 Biofilmwachstum mit variablen Wachstumsbedingungen

In diesem Kapitel wird das Wachstumsverhalten von *Geobacter sulfurreducens* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen beobachtet. Zunächst wird statt Acetat Glycerin als Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt. Glycerin kann von *Geobacter sulfurreducens* nicht direkt metabolisiert werden. Deswegen ist er auf andere Bakterien angewiesen, die Glycerin anaerob verstoffwechseln und einfachere Moleküle produzieren (z.B. Acetat, niedere Alkohole, siehe Abbildung 30), die von *Geobacter Sulfurreducens* verarbeitet werden können.<sup>[95]</sup> Diese Bakterien können auch den Biofilm bewohnen und ihn verändern, wobei sie nicht auf den Biofilm beschränkt sind, weil dieser anaerobe Metabolismus auch in der Volumenphase stattfinden kann.

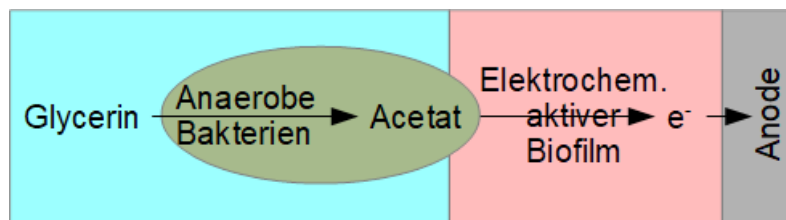


Abbildung 30: Schematische Ablauf des Glycerin-Stoffwechsels eines *Geobacter Sulfurreducens*-reichen Biofilms. Das Glycerin wird von anderen Bakterien vorverdaut und in kleinere Moleküle wie Acetat aufgespalten.

Als nächstes wird ein Biofilm ohne Zugabe von Vitaminen und Mineralien angezogen. Ohne die zusätzliche Zugabe dieser Stoffe müssen die Bakterien diese selbst produzieren. Zuletzt werden Biofilme bei unterschiedlichen Elektrodenpotentialen angezüchtet. Durch die Variation des Elektrodenpotentials kann der Energiegewinn der Zellen aus der Zellatmung gesteuert werden. Je niedriger das Potential ist, desto weniger Energie können sie aus dem Acetat produzieren.

#### 5.3.1 Wachstum mit Glycerin auf Torsions-Resonatoren

Abbildung 31 zeigt das Wachstum von zwei Biofilmen auf einem Torsions-Resonator, die mit Glycerin statt Acetat angezogen wurden. Biofilm A startet mit einer Glycerinkonzentration von 500 mg/L. In den ersten vier Tagen ist das Anwachsen des Biofilms auf dem Torsions-Resonator klar erkennbar. Der Strom steigt bis zu seinem Maximalwert von 0.67 mA/cm<sup>2</sup> an. Die Dicke nimmt mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von 10.6 µm/Tag linear zu bis sie ihren Maximalwert bei 45 µm erreicht hat. Im Gegensatz dazu wuchsen Acetatbiofilme so lange, dass

## 5. Ergebnisse und Auswertung

der Torsions-Resonator sie nicht mehr erfassen konnte ( $> 80 \mu\text{m}$ ). Die Steifigkeit nimmt ebenfalls zu und erreicht bei 1044 kPa ihr Maximum. Dieser Wert ist größer als der Wert, der typischerweise für Acetatbiofilme erreicht wird (siehe Kap. 5.4.4).

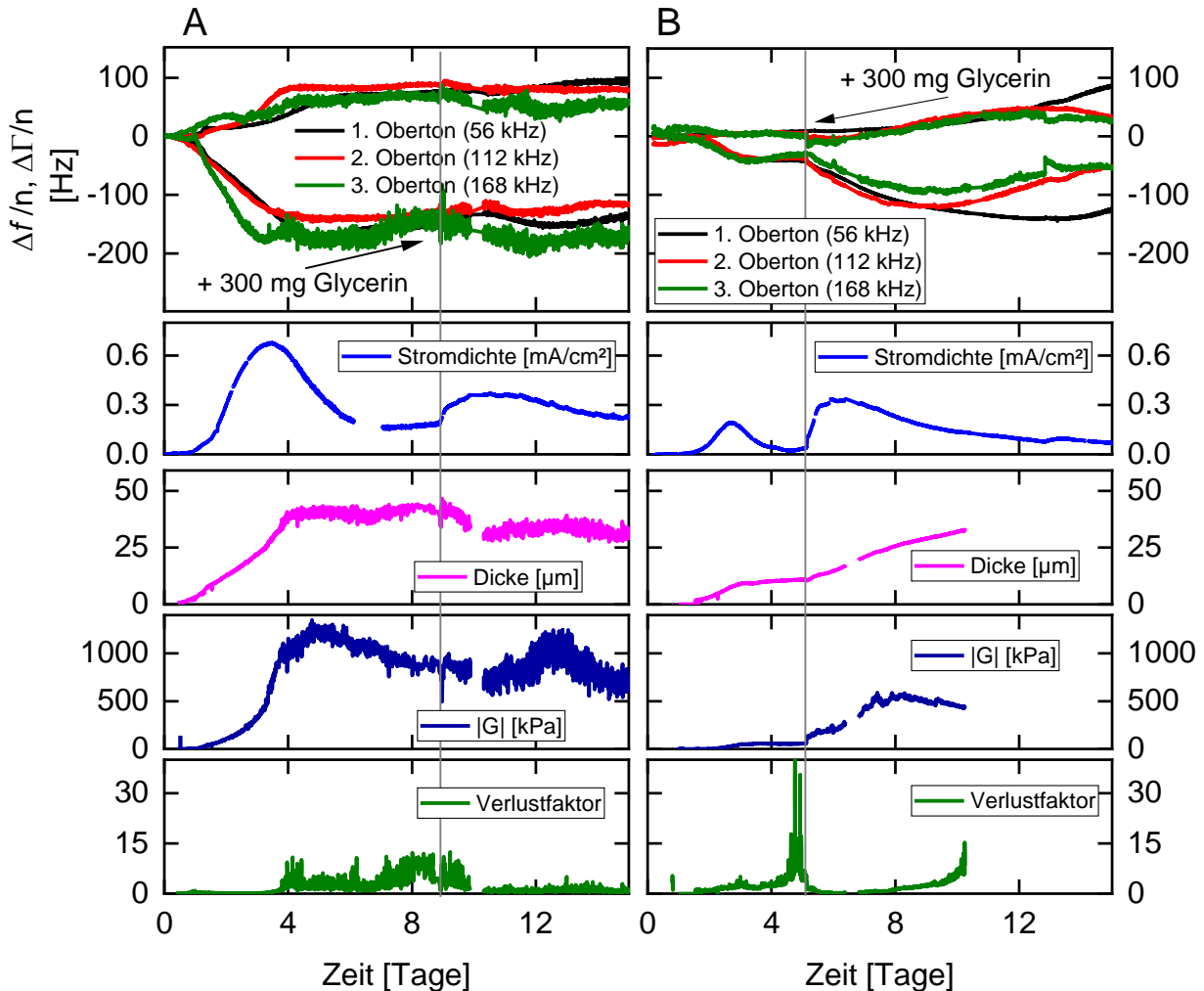


Abbildung 31: Wachstum zweier Biofilme mit Glycerin als Kohlenstoffquelle (Glycerin Vorlage: A: 0.5 g/L, B: 0.3 g/L).

Ab dem vierten Tag bleibt die Dicke konstant bei  $45 \mu\text{m}$ . Diese Begrenzung der Dicke konnte bei acetatgenährten Biofilmen nicht beobachtet werden. Die Stromdichte fällt ab und stabilisiert sich auf einen Wert von  $178 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , weil das Glycerin schnell aufgebraucht wird, sodass die Acetatproduktionsrate absinkt und mit dem Verbrauch nicht mehr mithalten kann. Die Steifigkeit fällt, wie bei Acetatbiofilmen, ebenfalls ab und stabilisiert sich auf einen Wert von 750 kPa.

Nach 9 Tagen werden weitere 300 mg Glycerin hinzugegeben. Der Acetatverbrauch des Biofilms ist schon so groß, dass die Acetatkonzentration nur geringfügig erhöht werden kann, sodass die Stromdichte nur auf einen Wert von  $363 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ansteigt. Mit leichter Verzögerung

zum Strom nimmt auch die Steifigkeit wieder zu und erreicht mit 1050 kPa wieder einen mit dem ersten Maximum vergleichbaren Wert. Allerdings erweicht der Biofilm recht schnell wieder, wenn die Stromdichte abfällt.

Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 31 B einen Biofilm, der mit einem Ansatz von 300 mg/L Glycerin angezogen worden ist. Auch in diesem Fall wächst der Biofilm an. Allerdings ist das Glycerin schnell verbraucht, sodass das Biofilmwachstum bereits bei einer Dicke von 10  $\mu\text{m}$  stagniert und der Strom auf 20  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  abfällt. Die Steifigkeit erreicht nur einen Wert von 60 kPa. Folglich ist dieser Biofilm noch sehr dünn und weich.

Durch die Zugabe von weiteren 300 mg Glycerin kann der Biofilm weiterwachsen. Das Verhältnis aus Acetatverbrauch und Acetatproduktion ist noch so weit auf Seiten der Produktion, dass sich die Acetatkonzentration erhöhen kann und die Stromdichte ihren Maximalwert erreicht, der mit 330  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  größer ist als das erste Maximum. Interessanterweise lag das zweite Maximum von Biofilm A auch in diesem Bereich. Die Dicke nimmt ebenfalls weiter zu und stabilisiert sich bei ca. 35  $\mu\text{m}$ . Die Steifigkeit steigt ebenfalls an und erreicht einen Maximalwert von ca. 500 kPa. Damit ist Biofilm B weicher als Biofilm A.

Die Diagramme A1 und B1 in Abbildung 32 zeigen die Stromdichte in Abhängigkeit von der Biofilmdicke mit Glycerin als Nährstoff für die beiden Biofilme aus Abbildung 31. Bei Biofilm A kommt es nach einer Initialisierungsphase zwischen 0 und 10  $\mu\text{m}$  zu einem linearen Wachstum der Stromdichte mit der Biofilmdicke bis zu einer Dicke von 20  $\mu\text{m}$ . Die Stromeffizienz ist mit einem Wert von 500  $\mu\text{A}/\text{mm}^3$  vergleichbar mit der Effizienz von acetatbasierten Biofilmen. Dies zeigt, dass sich die Zelldichte von *Geobacter sulfurreducens* im Biofilm durch das Glycerin nicht geändert hat. Allerdings könnte die höhere Steifigkeit ein Hinweis auf eine höhere Zellenkonzentration im Biofilm sein. Oberhalb von 20  $\mu\text{m}$  bleibt die Stromdichte konstant. Ab einer Dicke von 40  $\mu\text{m}$  bleibt auch die Biofilmdicke konstant. Der Abfall der Stromdichte in diesem Bereich ist rein acetatbedingt.

Bei Biofilm B ist die Initialisierungsphase nur schwach im Bereich des ersten Mikrometer erkennbar. Danach steigt der Strom direkt linear mit der Stromdichte an. Die Stromeffizienz ist in diesem Fall mit 309  $\mu\text{A}/\text{mm}^3$  etwas kleiner als die von Biofilm A, allerdings noch innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite. Das Biofilmwachstum stoppt und die Stromdichte fällt ab, sobald das Glycerin aufgebraucht ist. Nach der Zugabe von neuem Glycerin wächst Biofilm weiter. Über die Stromeffizienz lässt sich in diesem Bereich keine sinnvolle Aussage treffen, weil die Stromdichte komplett durch die äußeren Parameter kontrolliert ist.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

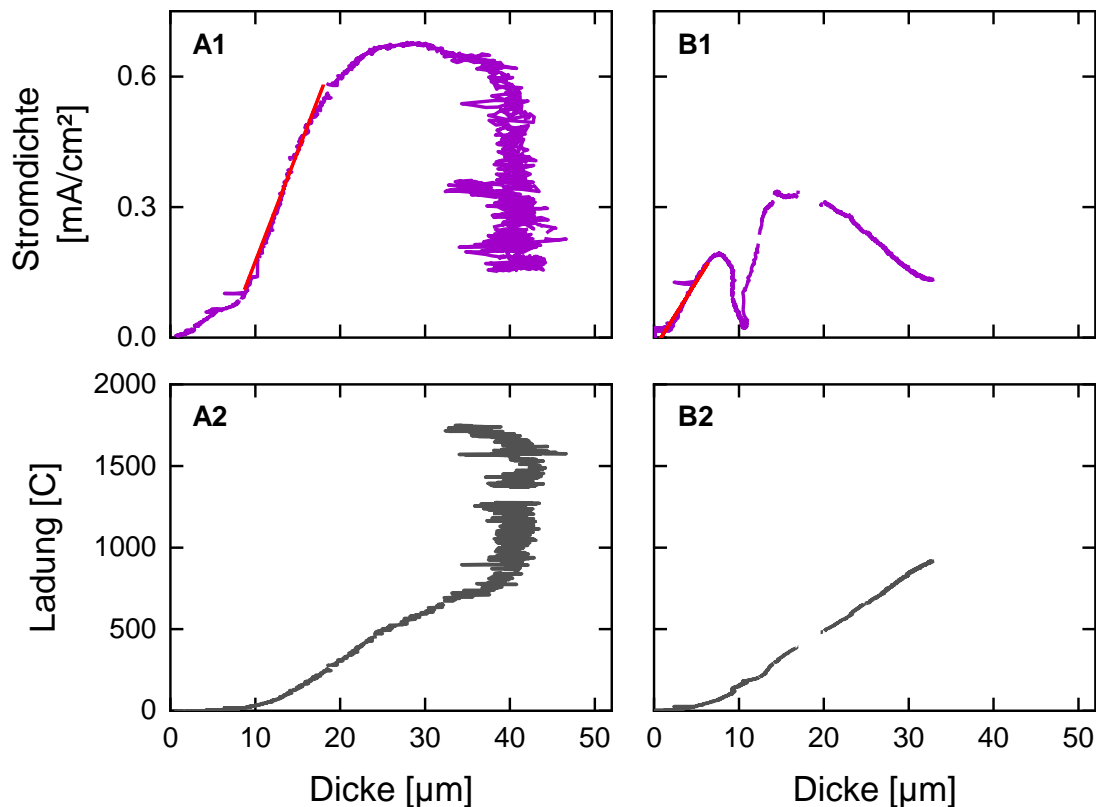


Abbildung 32: Zusammenhang zwischen der Dicke und der Ladung bzw. dem Strom für Glycerinbiofilme.

Abbildung 32 A2 und B2 zeigen die Abhängigkeit der Biofilmdicke von der Ladung. Bei beiden Biofilmen gibt es bis ca. 10 µm einen Bereich, in dem der Biofilm wächst, ohne dass eine korrespondierende Ladung geflossen ist. Ein solches Verhalten konnte bei Acetatbiofilmen nicht in dieser Ausprägung beobachtet werden. Dies zeigt, dass zunächst die Glycerin-verarbeitenden Bakterien anwachsen und Acetat für *Geobacter sulfurreducens* produzieren. Erst wenn ausreichend Acetat vorhanden ist, kann *Geobacter sulfurreducens* wachsen und Strom generieren.

Oberhalb von 10 µm wächst der Biofilm näherungsweise linear und Faraday-artig an. Die Faraday-Effizienz liegt für beide Biofilme bei ca. 20 µg/C. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Faraday-Effizienz von Acetatbiofilmen. Ab einer Dicke von 40 µm bleibt die Biofilmdicke konstant. Der Biofilm wächst nicht weiter. Das Verhalten ist nicht mehr Faraday-artig.

Insgesamt zeigt das Biofilmwachstum mit Glycerin als Kohlenstoffquelle Gemeinsamkeiten, aber auch signifikante Unterschiede im Vergleich zu Acetatbiofilmen. Der wichtigste Unterschied ist die Acetatkonzentration, die das Wachstumsverhalten und die Stromproduktion



des Biofilms dominiert und erst aus dem Glycerin gebildet werden muss. Die Acetatkonzentration ergibt sich aus einem komplexen Zusammenspiel der Glycerin-Konzentration, der Acetatsyntheserate und dem Acetatabbaurate. Dadurch wird das Verhalten von Glycerinbiofilmen heterogener im Vergleich zu Biofilmen mit einer Überschusskonzentration an Acetat.

Dies zeigt sich besonders an der Stromdichte, die nach Erreichen ihres Maximums schnell wieder abfällt und im Wesentlichen durch die Acetatkonzentration bestimmt wird. Als Reaktion auf diesen Mangel stellt sich vermutlich auch die maximale Biofilmdicke von 45  $\mu\text{m}$  ein.

Andererseits sind die maximale Stromdichte, die Faraday-Effizienz und die Wachstumsgeschwindigkeit vergleichbar mit denen von Acetatbiofilmen.

### 5.3.2 Wachstum mit Glycerin auf Dicken-Scher-Resonatoren

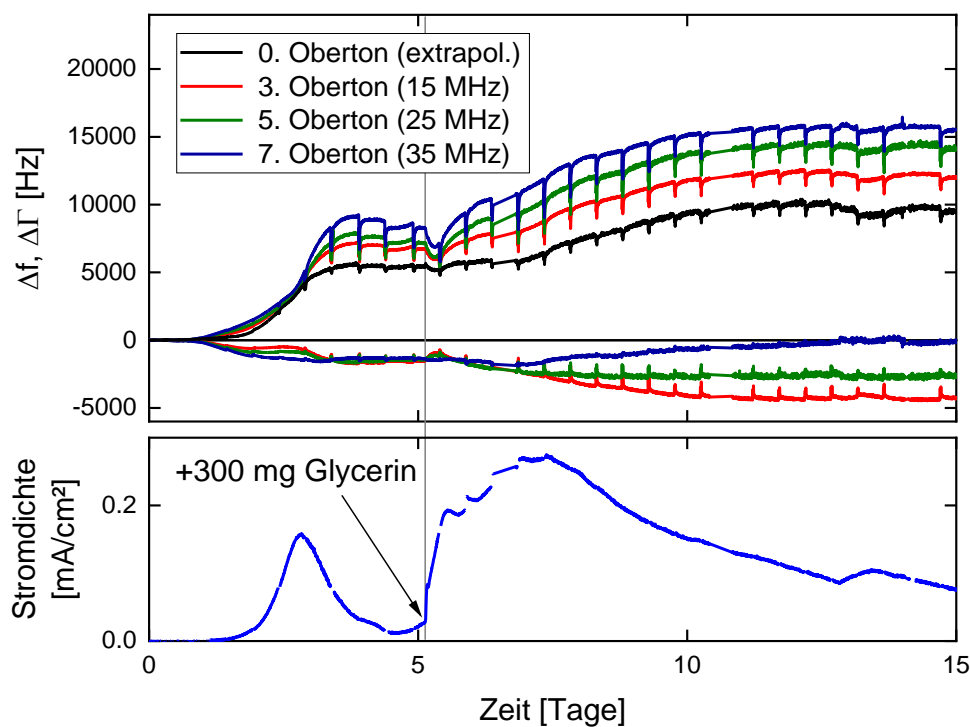


Abbildung 33: Wachstum eines Biofilms von *Geobacter sulfurreducens* auf einem Dicken-Scher-Resonator mit Glycerin (300 mg/L) als Nährstoff. Die Bedingungen sind die gleichen wie in Abbildung 31 B.

Abbildung 33 zeigt das Wachstum eines Biofilms mit Glycerin auf einem Dicken-Scher-Resonator. Die Wachstumsbedingungen entsprechen denen aus Abbildung 31 B mit einer Glycerinkonzentration von 300 mg/L in der Vorlage der Nährlösung. Nach einer kurzen Initiierungsphase nach der Inokulation beginnt der Biofilm zu wachsen. Sowohl Bandbreite als auch Strom steigen an. Im Gegensatz zu Acetatbiofilmen (siehe Abbildung 26) gibt es hier schon zu

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Beginn eine signifikante Frequenzverschiebung, die allerdings im Vergleich zur Bandbreitenverschiebung klein ist. Auch die Obertonabhängigkeit der Bandbreitenverschiebung ist nicht mehr streng unabhängig von der Obertonordnung. Eine leichte Abweichung ist erkennbar. Sobald die Stromdichte ihren Maximalwert erreicht hat und wieder abfällt, bleibt die Bandbreitenverschiebung konstant. Dies passt zu der Erkenntnis aus Abbildung 31 B, dass in diesem Bereich der Biofilm nicht mehr wächst. Die aus Kap. 5.2.1 bekannte Aufspaltung der Obertöne hat sich schon ausgebildet. Nach der Zugabe von weiteren 300 mg/L Glycerin steigt der Strom wieder an, und erreicht mit 0.28 mA/cm<sup>2</sup> sein Maximum, welches fast doppelt so groß ist wie das erste Maximum. Die Bandbreitenverschiebung steigt nach der Zugabe des Glycerins wieder an. Die Obertonabhängigkeit der Bandbreite ändert sich in diesem Bereich nicht, während sich die Frequenzverschiebungen auf den verschiedenen Obertönen beginnen aufzufächern.

Insgesamt ist das Verhalten der Glycerinbiofilme dem Verhalten der Acetatbiofilme sehr ähnlich. Der einzige Unterschied ist die Frequenzverschiebung, die direkt nach der Inokulation leicht abfällt. Dieser Bereich kann durch die Glycerin-verarbeitenden Bakterien hervorgerufen werden, die die Elektrode zuerst besiedeln. Sobald *Geobacter sulfurreducens* wachsen kann, nivellieren sich diese Effekte und das Verhalten des Dicken-Scher-Resonators wird durch die Pili von *Geobacter sulfurreducens* dominiert.

### 5.3.3 Wachstum ohne Vitamin- und Mineralien-Lösung

Der Standardnährlösung werden sowohl Vitamine wie auch Mineralien beigesetzt, die *Geobacter sulfurreducens* für sein Wachstum braucht. In diesem Experiment wurde überprüft, ob *Geobacter sulfurreducens* auch ohne diese wachsen kann bzw. welchen Einfluss das Weglassen auf das Biofilmwachstum hat. Deswegen wird ein Biofilm mit einer Nährlösung angezogen, die nur die Pufferlösung und Acetat enthält.

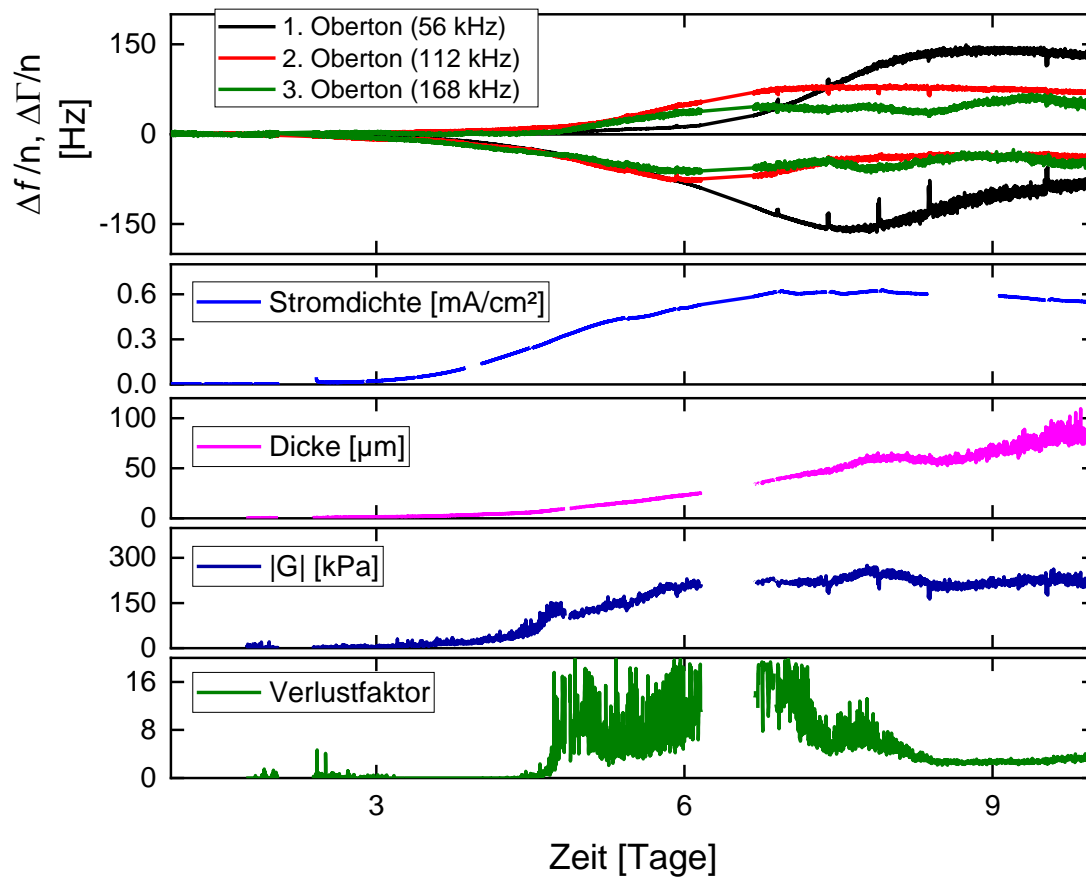


Abbildung 34: Biofilmwachstum auf einem Torsionsresonator ohne Mineralien- und Vitaminmix.

Abbildung 34 zeigt das Wachstum von *Geobacter sulfurreducens* auf einem Torsions-Resonator ohne Zusatz von Mineralien- und Vitaminlösung. Das Wachstumsverhalten lässt sich kaum von einem Biofilm mit Standardnährlösung (siehe Abbildung 28) unterscheiden. Der Strom steigt zunächst an, durchschreitet ein Maximum bei 0.61 mA/cm<sup>2</sup> und fällt anschließend wieder leicht ab. Die Wachstumsgeschwindigkeit im linearen Bereich ist mit einem Wert von 15.5 µm/Tag vergleichbar mit einem normalen Biofilm. Die Steifigkeit nimmt mit der Stromdichte zu und erreicht einen Plateauwert bei 227 kPa.

Abbildung 35 A zeigt die Abhängigkeit der Stromdichte von der Biofilmdicke für einen Biofilm, der ohne Zugabe von Vitaminen und Mineralien angezogen wurden ist. Der Strom nimmt zunächst mit der Biofilmdicke zu. Der Verlauf ist in grober Näherung linear mit einer Stromeffizienz von 342 µA/mm<sup>3</sup>. Im Vergleich zu Abbildung 29 und Abbildung 32 ist diese Linearität jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Dies zeigt, dass hier Energie für die Vitaminsynthese aufgewendet werden musste, auch wenn der Einfluss dieser Synthese insgesamt klein bleibt.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

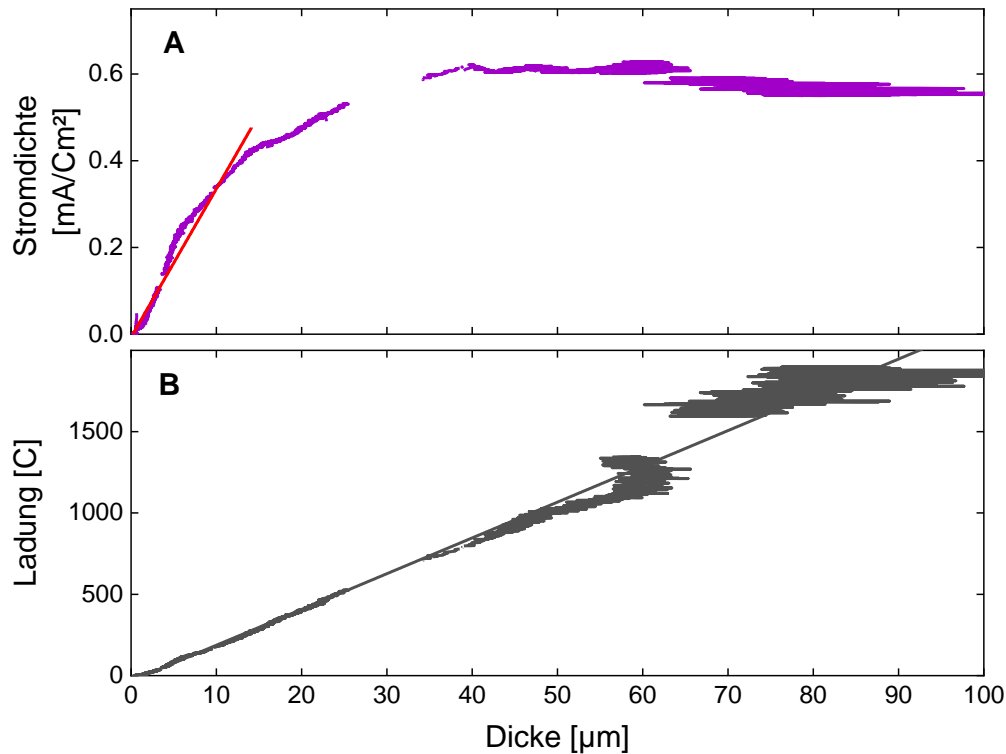


Abbildung 35: Abhängigkeit der Stromdichte und der Ladung von der Biofilmdicke.

Abbildung 35 B zeigt den Anstieg der Ladung mit der Biofilmdicke. Bis zu einer Dicke von 50  $\mu\text{m}$  sind beide Größen zueinander proportional – das Wachstum erfolgt Faraday-artig. Die Faraday-Effizienz liegt bei 32.1  $\mu\text{g/C}$ . Dieser Wert ist geringfügig größer als für Acetatbiofilme. Oberhalb von 50  $\mu\text{m}$  verlangsamt sich das Wachstum, wodurch die Steigung größer wird.

Insgesamt zeigt sich, dass die Änderungen, die durch das Fehlen der Vitamin- und Mineralienlösung entstehen, minimal sind. Dies zeigt, dass die Vitaminsynthese keinen großen Aufwand für den Biofilm darstellt. Es ist aber verwunderlich, dass das Fehlen der Mineralienlösung zu keinen Problemen führt. Die Metallionen können nicht von den Bakterien hergestellt werden, sind aber für den Aufbau bestimmter Cofaktoren essentiell. So benötigt z.B. *Geobacter sulfurreducens* Eisen zum Aufbau seiner Cytochrome. Deren Anwesenheit konnte an der roten Farbe des Biofilms erkannt werden. Eine Quelle für die Ionen könnte die Gegenelektrode sein. Diese besteht aus einem Stahlblech, das mit der Zeit Ionen an die Lösung abgeben kann.

### 5.3.4 Wachstum bei verschiedenen Potentialen

In diesem Abschnitt wird das Biofilmwachstum bei unterschiedlichen, konstanten Elektrodenpotentialen untersucht. Als terminalem Elektronenakzeptor des Bakterienmetabolismus kommt der Elektrode eine wichtige Funktion zu. Eine Absenkung des Elektrodenpotentials

senkt deren Oxidationsvermögen, sodass es dem Biofilm erschwert wird, seine Elektronen an die Elektrode abzugeben.

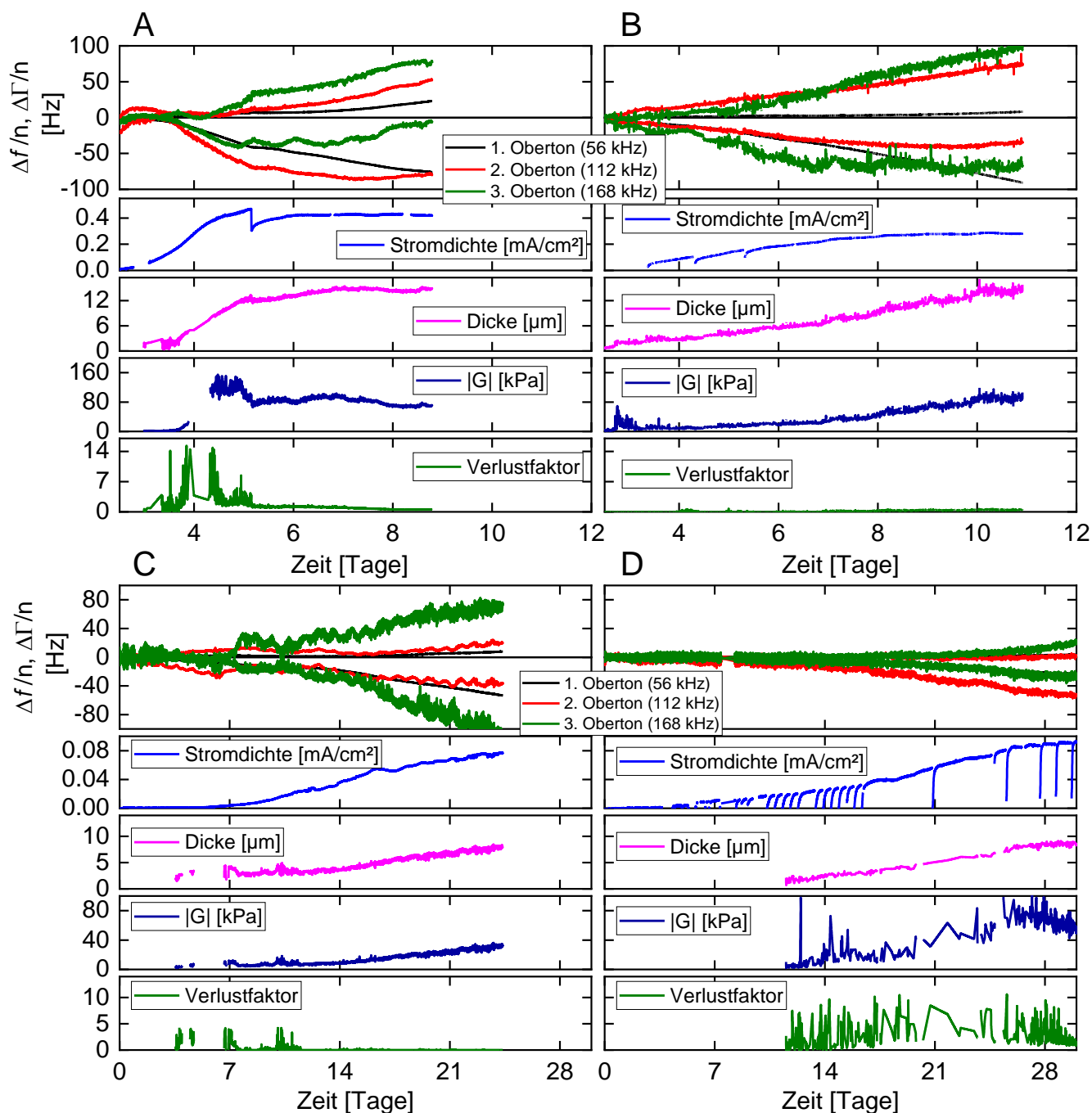


Abbildung 36: Biofilmwachstum bei einem konstanten Elektrodenpotential (gg. SCE) der Arbeitselektrode von A: -290 mV, B: -340 mV, C: -390 mV und D: -440 mV.

Abbildung 36 zeigt das Wachstum von vier verschiedenen Biofilmen bei unterschiedlichen Potentialen (A: -290 mV, B: -340 mV, C: -390 mV, D: -440 mV). In diesem Potentialbereich reagiert der Biofilm besonders sensitiv auf das Potential, da sich die Redoxpotentiale der leitfähigen Komponenten des Biofilms in diesem Potentialbereich befinden (vgl. Kap. 2.2.2).<sup>[56]</sup>

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Bei allen vier Elektrodenpotentialen kommt es zu einem Biofilmwachstum auf dem Torsions-Resonator. Bei Biofilm A ( $-290\text{ mV}$ ) ist das Wachstumsverhalten noch vergleichbar mit dem Wachstum beim Standardpotential ( $-240\text{ mV}$ , vgl. Kapitel 5.2.2). Die Stromdichte steigt zunächst an und erreicht ein Maximalwert, auf dem sie auch verbleibt. Der Schermodul nimmt zunächst zu, durchläuft dann ein Maximum bei  $131\text{ kPa}$  und stabilisiert sich auf einem Niveau von ca.  $80\text{ kPa}$ . Der Verlustfaktor ist zunächst stark verrauscht. Später stabilisiert er sich bei einem Wert von ca.  $0.5$ . Die Dicke nimmt zunächst bis zu einem Wert von  $12\text{ }\mu\text{m}$  schnell zu. Danach verlangsamt sich das Wachstum deutlich.

Das Wachstumsverhalten von Biofilm B ( $-340\text{ mV}$ ) besitzt noch eine gewisse Ähnlichkeit zu Biofilm A. Allerdings ist die Wachstumsgeschwindigkeit schon deutlich gesunken. Der Schermodul durchläuft kein Maximum mehr. Er nähert sich stattdessen langsam seinem Plateauwert an. Die Höhe des Plateaus ist aber noch mit Biofilm A vergleichbar. Der Verlustfaktor bleibt in diesem Fall durchgehend klein.

Die Biofilme C ( $-390\text{ mV}$ ) und D ( $-440\text{ mV}$ ) wachsen nur noch sehr langsam. Ein stationärer Zustand konnte im Rahmen der Messzeit nur näherungsweise erreicht werden. Die Stromdichte steigt langsam an, bleibt aber insgesamt auf einem deutlich niedrigeren Niveau als bei den anderen Biofilmen. Die erreichten Biofilmdicken sind im Vergleich zu A und B mit knapp  $10\text{ }\mu\text{m}$  nur etwas kleiner. Der Schermodul ist bei Biofilm C mit  $30\text{ kPa}$  klein. Bei Biofilm D steigt er bis zu einem Wert von  $80\text{ kPa}$  an. Dies könnte jedoch auch nur ein Artefakt sein, welches durch den Fit entsteht. Wie in Kap. 4.3.2 erwähnt, ist der Wert von  $|G|$  stark von bestimmten Annahmen abhängig.

Abbildung 37 fasst einige Abhängigkeiten vom Potential noch einmal vergleichend zusammen. Abbildung 37 A zeigt die maximale Stromdichte in Abhängigkeit vom Anodenpotential. Je negativer das Elektrodenpotential ist, desto kleiner wird auch die maximale Stromdichte. Dieses Verhalten ist verständlich, weil bei negativeren Potentialen das Oxidationsvermögen der Elektrode gesenkt wird, wodurch der Zellmetabolismus langsamer ablaufen muss.

Abbildung 37 B zeigt die Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Anodenpotential. Bis zu einem Potential von  $-290\text{ mV}$  bleibt die Wachstumsgeschwindigkeit in etwa konstant. In diesem Bereich ist das Oxidationsvermögen der Anode noch so gut, dass das Zellwachstum kaum beeinflusst wird. Im Potentialbereich zwischen  $-290\text{ mV}$  und  $-390\text{ mV}$  verringert sich die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich, bis sie sich ab einem Potential von  $-390\text{ mV}$  auf einem niedrigen Niveau stabilisiert. Dieses Verhalten ist in dieser Form erwartbar. Je negativer das Elektrodenpotential ist, desto langsamer ist die Acetatoxidation, sodass

einer Zelle in der gleichen Zeit weniger Energie zum Biomasseaufbau zur Verfügung steht. Dadurch sinkt die Wachstumsgeschwindigkeit ab. Das Wachstum bei den negativsten Potentialen kann auch von Bakterien stammen, die nicht elektrochemisch aktiv sind und in der verwendeten Mischkultur vorhanden sind.

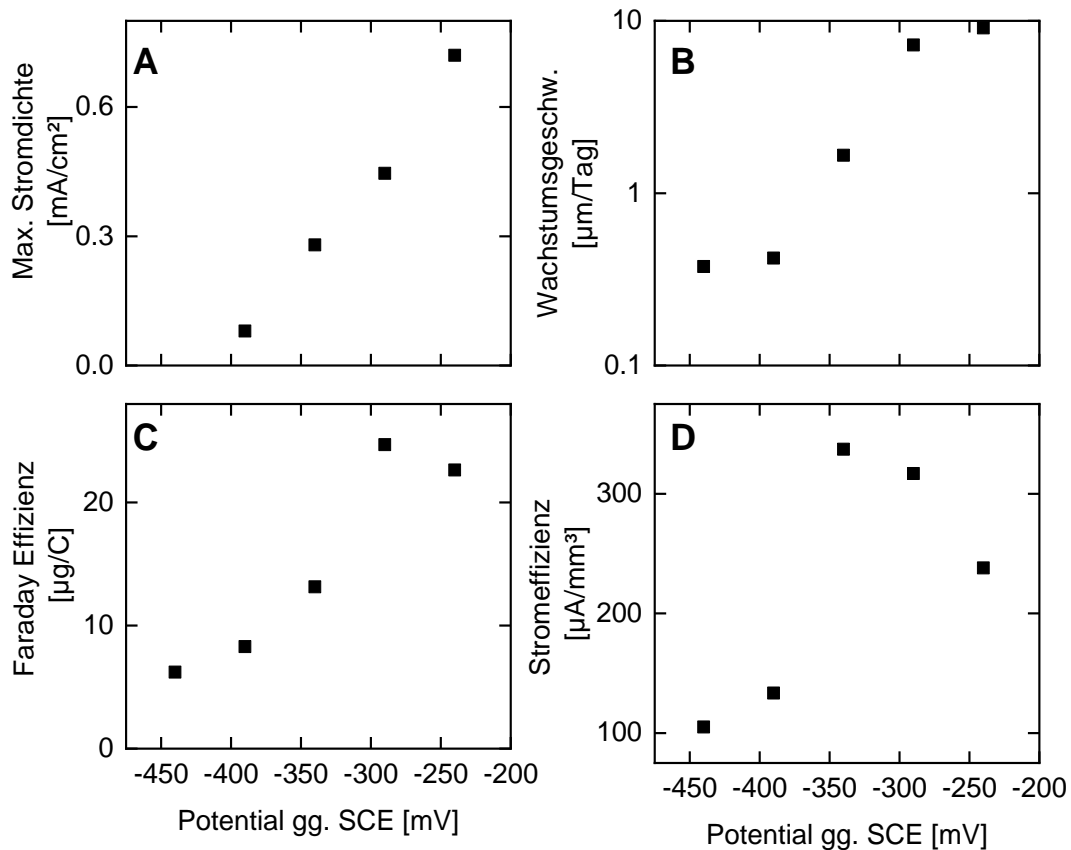


Abbildung 37: Einfluss des Potentials auf die A) Stromeffizienz im linearen Bereich, B) Wachstumsgeschwindigkeit des Biofilms (logarithmisch skaliert), C) Faraday Effizienz und D) Maximale Stromdichte.

Abbildung 37 C zeigt die Faraday-Effizienz bei den verschiedenen Elektrodenpotentialen. Die Faraday-Effizienz gibt an, wie viel Biofilmmasse aus einer geflossenen Ladungseinheit aufgebaut wird. Die Werte gelten jeweils für den linearen Bereich zwischen Ladung und Biofilmdicke. Wird das Potential der Arbeitselektrode negativer, dann sinkt auch die Faraday-Effizienz ab. Das heißt, dass bei einem negativeren Potential für einen gleichdicken Biofilm mehr Ladung fließen muss als bei einem positiveren Potential. Dies deutet darauf hin, dass die Bakterien einen gewissen Grundumsatz an Energie haben, der nicht für den Biofilmaufbau verwendet werden kann, sodass bei kleineren Stromdichten verhältnismäßig weniger Energie für den Biofilmaufbau zur Verfügung steht. Alternativ könnten bei diesen Potentialen auch mehr Bak-

## 5. Ergebnisse und Auswertung

terien oder EPS den Biofilm verlassen und in die planktonische Phase übergehen. Für *Geobacter sulfurreducens* ist bekannt, dass er eine große Menge an löslichen EPS bildet.<sup>[47]</sup> Durch diesen Verlust an Zellen und EPS sinkt die Wachstumsgeschwindigkeit und der Verbrauch an Acetat steigt an. Untersuchungen, die von BOSCH *et al.* durchgeführt wurden sind, kamen zu einem anderen Ergebnis. Bei ihnen blieb die Faraday-Effizienz konstant.<sup>[96]</sup> Allerdings wurden für diese Versuche Reinkulturen von *Geobacter sulfurreducens* verwendet. Daher wird anscheinend die Anlagerung von anderen Zellen an den Biofilm unterstützt, wenn es *Geobacter sulfurreducens* gut geht.

Abbildung 37 D zeigt die Stromeffizienz in Abhängigkeit vom Anodenpotential. Die Stromeffizienz gibt an, wieviel Strom ein Volumenelement des Biofilms produziert. Die Werte wurden für den linear-ansteigenden Bereich zwischen Stromdichte und Dicke während der Wachstumsphase des Biofilms berechnet. Die Stromeffizienz steigt zunächst an, wenn das Potential negativer wird. Unterhalb eines Potentials von  $-340$  mV fällt die Stromeffizienz deutlich ab. Der erste Anstieg ist unerwartet, vor allem weil auch die maximale Stromdichte insgesamt sinkt (vgl. Abbildung 37 A). Möglicherweise ist in diesem Fall der Biofilm leitfähiger, weil die Zellen aufgrund der langsameren Wachstumsgeschwindigkeit mehr Zeit haben, um leitfähige Strukturen (z.B. Pili, Mediatoren etc.) auszubilden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Biofilme bei negativeren Potentialen langsamer wachsen und kleinere Stromdichten erreichen. Bereits bei  $-290$  mV zeigt sich eine Begrenzung der Biofilmdicke auf etwa  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Die Biofilmdicken der anderen Biofilme erreichten aufgrund ihres langsamen Wachstums keinen stationären Zustand mehr, blieben allerdings immer unterhalb von  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Die Steifigkeit der Biofilme nimmt ebenfalls mit dem sinkenden Elektrodenpotential ab, wobei bei kleinen Potentialen das Verhalten uneinheitlich wird.

### 5.4 Weitere Parameter Abhängigkeiten

In diesem Abschnitt wird untersucht, wie sich verschiedene Parameter wie z.B. die maximale Stromdichte, die Stromeffizienz, die Faraday-Effizienz oder die Pili-effizienz auf Änderung der äußeren Parameter wie Acetatkonzentration oder der Temperatur reagieren. Die Werte stammen von einer Vielzahl von Biofillexperimenten. Eine Übersicht über alle Experimente befindet sich im Anhang (siehe Kap. 9.4).



### 5.4.1 Einfluss der Acetatkonzentration auf die Stromproduktion

Acetat ist ein zentraler Bestandteil der Nährlösung. Es dient sowohl als Energiequelle als auch als Kohlenstoffquelle für den Zell- und Biofilmaufbau. In diesem Kapitel wird die Abhängigkeit der Stromdichte von der Acetatkonzentration bei verschiedenen Biofilmdicken untersucht. Dafür werden Biofilme bis zu einer definierten Dicke angezogen. Dann wird die Nährlösung durch eine Pufferlösung ersetzt, die anschließend portionsweise mit Acetat versetzt wird. Die Zeit zwischen den Zugaben wird so gewählt, dass die Acetatmenge, die in dieser Zeit verbraucht wird, vernachlässigbar klein ist.

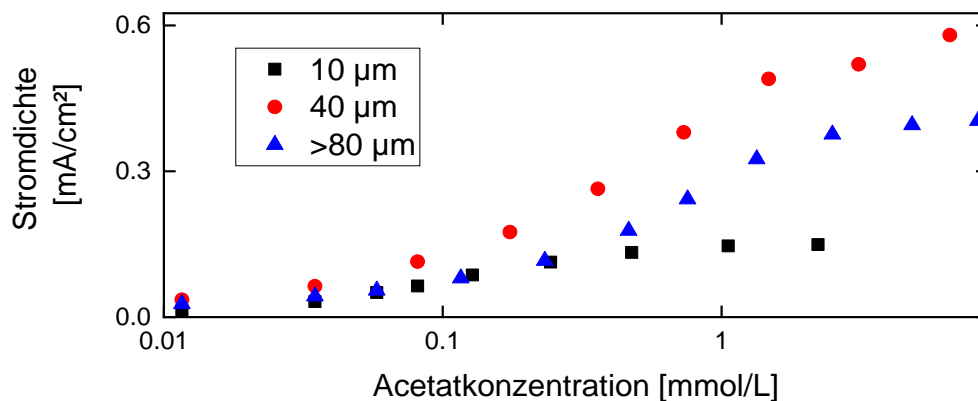


Abbildung 38: Abhängigkeit der Stromdichte von der Acetatkonzentration. Der Biofilm wurde bis zur angegebenen Dicke angezogen. Danach wurde das Nährmedium durch den Phosphatpuffer ersetzt. Anschließend wurde sukzessive die Acetatkonzentration wieder erhöht.

Abbildung 38 zeigt die Abhängigkeit der Stromdichte von der Acetatkonzentration für Biofilme mit verschiedenen Dicken (10 µm, 40 µm und mehr als 80 µm). Im Bereich von 0 bis 0,2 mM reagiert die Stromdichte sehr sensitiv auf Änderungen der Acetatkonzentration. Die Stromdichte ist in diesem Bereich beinahe unabhängig von der Biofilmdicke.

Bei höheren Acetatkonzentrationen (> 0,2 mM) steigt die Stromdichte weiter an, bis sie ein Plateau erreicht. Die Höhe des Plateaus ist abhängig von der Biofilmdicke: Der dünnste Biofilm erreicht seine maximale Stromdichte bei einer Acetatkonzentration von 1 mM. Die größte Stromdichte erreicht der Biofilm mit einer Dicke von 40 µm. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen aus Kap. 5.4.3. In diesem Bereich sind alle Bakterien voll ausgelastet. Die verschiedenen Stofftransporte innerhalb des Biofilms wirken noch nicht strombegrenzend.

Bei dem dicksten Biofilm nimmt die maximale Stromdichte im Vergleich zum 40 µm Biofilm wieder ab. Dass eine Erhöhung der Acetatkonzentration an dieser Stelle zu keiner höheren

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Stromdichte führt, zeigt, dass nicht der Acetattransport durch den Biofilm die Stromdichte begrenzt. Daher muss entweder der Ladungsabtransport oder der Abfallabtransport die Stromdichte begrenzen.

### 5.4.2 Einfluss der Temperatur

Durch eine Erhöhung der Temperatur können Transportvorgänge schneller ablaufen und auch die Reaktionsgeschwindigkeiten chemischer Reaktionen nehmen zu. Besonders biologische Reaktionen können eine komplexe Temperaturabhängigkeit besitzen.<sup>[97]</sup>

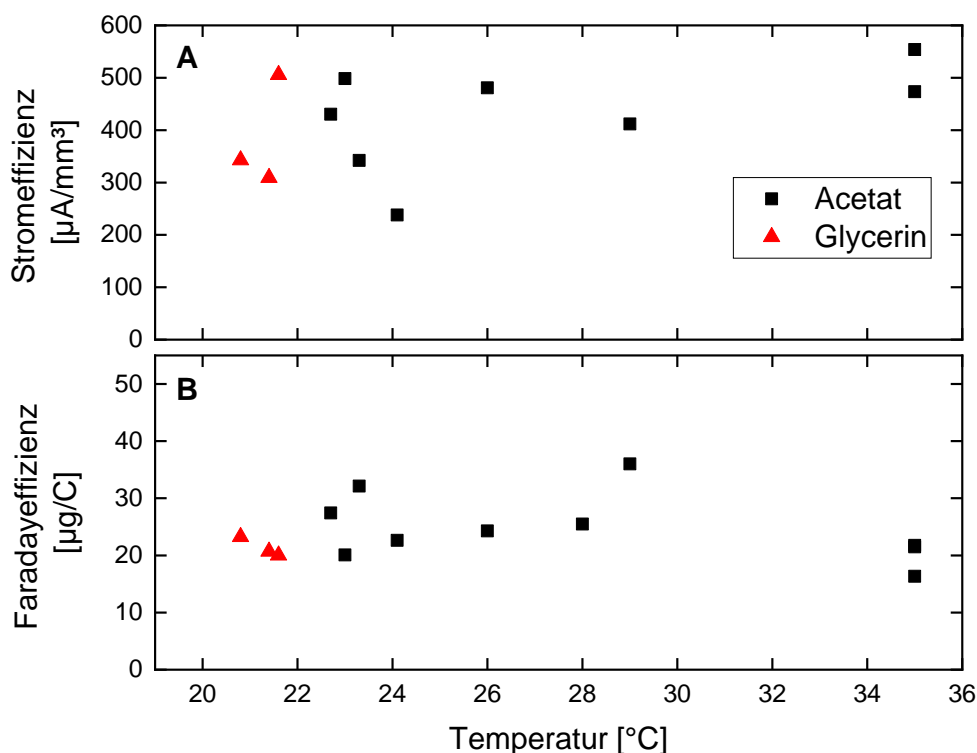


Abbildung 39: Temperaturabhängigkeit der Strom- und Faraday-Effizienz.

Abbildung 39 A zeigt die Temperaturabhängigkeit der Stromeffizienz für Biofilme, die mit Acetat oder Glycerin angezogen wurden sind. Die Stromeffizienz wurde jeweils für den linearen Bereich zwischen Stromdichte und Biofilmdicke in der Anfangsphase des Biofilmwachstums berechnet. Sie schwankt in einem Bereich zwischen 500  $\mu\text{A}/\text{mm}^3$  und 200  $\mu\text{A}/\text{mm}^3$ . Es ist eine leichte Abnahme hin zu kleineren Temperaturen erkennbar. Im Mittel liegt die Stromeffizienz bei  $(407 \pm 100) \mu\text{A}/\text{mm}^3$ . Die Glycerinbiofilme fügen sich gut in das Bild der Acetatbiofilme ein. Der Umstand, dass die Stromeffizienz beinahe unabhängig von der Temperatur ist, zeigt, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Stromproduktion in der Anfangsphase des Biofilmwachstums nur eine geringe Temperaturabhängigkeit hat. Es ist bekannt, dass

die Leitfähigkeit des Biofilms im relevanten Bereich unabhängig von der Temperatur ist.<sup>[41]</sup> Daher ist es wahrscheinlich, dass der Ladungstransport die Stromeffizienz begrenzt.

Abbildung 39 B zeigt die Temperaturabhängigkeit der Faraday-Effizienz. Die Berechnung erfolgte jeweils aus dem linearen Bereich der Biofilmdicke-Ladungs Kurven. Auch hier fügen sich die Daten der Glycerinbiofilme gut in das Bild der Acetatbiofilme ein. Der Verlauf ist entfernt parabelförmig mit einem Maximum bei ca. 28 °C. Die biologische Varianz ist aber auch hier deutlich ausgeprägter als die Temperaturabhängigkeit. Im Durchschnitt liegt die Faraday-Effizienz bei 23.5 µg/C.

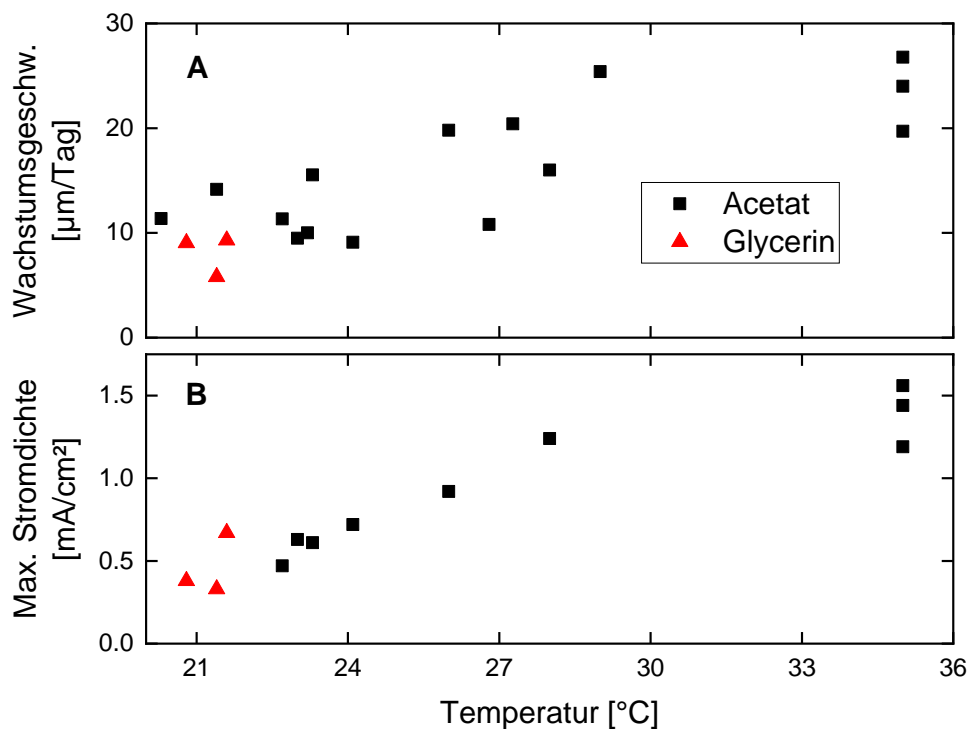


Abbildung 40: Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit (A) und der maximalen Stromdichte (B) von der Temperatur.

Abbildung 40 A zeigt die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit des Biofilms von der Temperatur. Für Biofilme mit Standardansatz steigt die Wachstumsgeschwindigkeit in einem Temperaturbereich von 20 °C bis ca. 28 °C von ca. 10 µm/Tag auf ca. 20 µm/Tag an. Bis zu einer Temperatur von 35 °C bleibt die Wachstumsgeschwindigkeit näherungsweise konstant. Die mit Glycerin als Kohlenstoffquelle angezogenen Biofilme (vgl. 5.3) fügen sich gut in dieses Bild ein. Eine Linearisierung nach Arrhenius ergibt für die apparente Aktivierungsenergie des Wachstumsprozesses einen Wert von 43.4 kJ/mol.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Abbildung 40 B zeigt die Temperaturabhängigkeit der maximalen Stromdichte. Die maximale Stromdichte nimmt mit der Temperatur im Bereich zwischen 20 °C und 30 °C beinahe linear zu. Danach bleibt sie in etwa konstant. Der Anstieg ist auf einen schnelleren Zellmetabolismus zurückzuführen. Eine Auftragung nach Arrhenius ergibt eine apparente Aktivierungsenergie der Stromproduktion von 48.3 kJ/mol.

Ein Vergleich von A und B zeigt den engen Zusammenhang zwischen maximaler Stromdichte und Wachstumsgeschwindigkeit. Ist die Stromdichte hoch, dann steht den Zellen mehr Energie für den Biofilmaufbau zur Verfügung, sodass die Biofilme schneller wachsen können.

### 5.4.3 Optimale Biofilmdicke

Für den Einsatz elektrochemisch aktiver Biofilme als Stromproduzenten ist es wichtig zu wissen, unter welchen Bedingungen sie ihre optimale elektrische Leistung erzielen können.

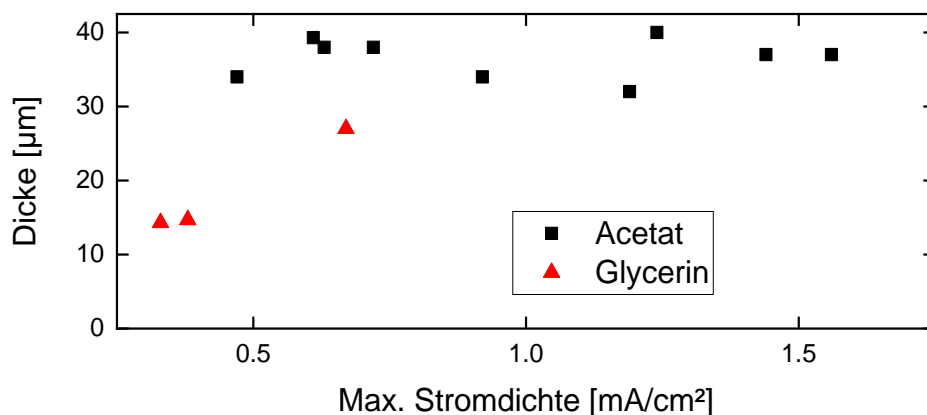


Abbildung 41: Biofilmdicke der maximalen Stromdichte.

Abbildung 41 zeigt die Biofilmdicke, bei der die maximale Stromdichte erreicht wird. Für Biofilme mit Acetat als Substrat beträgt diese ( $36.6 \pm 2.7$ ) µm und ist im Wesentlichen unabhängig von äußeren Parametern wie der Temperatur, der maximalen Stromdichte oder der Biofilmsteifigkeit.

Glycerinbiofilme haben eine kleinere ideale Biofilmdicke als Acetatbiofilme. Allerdings ist die Bestimmung auch fehleranfälliger, weil die maximale Stromdichte von der Acetatproduktionsrate abhängt. Diese ist stark von den äußeren Bedingungen abhängig.

### 5.4.4 Steifigkeit

Es hat sich herausgestellt, dass der Betrag des Schermoduls  $|\tilde{G}|$ , der die Steifigkeit des Biofilms angibt, ein Indikator für die Bestimmung des Biofilmwohlergehen ist. Abbildung 42 zeigt

die Abhängigkeit zwischen dem maximalen Schermodul und der maximalen Stromdichte. Für Biofilme mit Acetat als Kohlenstoffquelle nimmt die Steifigkeit in einem Bereich zwischen 0.5 und 1.0 mA/cm<sup>2</sup> linear mit der maximalen Stromdichte zu. Da die Stromdichte mit der Temperatur zunimmt, nimmt auch die Steifigkeit des Biofilms mit der Temperatur zu. Oberhalb von dieser Stromdichte bleibt die Steifigkeit konstant. Allerdings besitzen die beiden Punkte oberhalb von 1 mA/cm<sup>2</sup> keine hohe statistische Signifikanz. Für ein Hydrogel würde man erwarten, dass es weicher wird, wenn die Temperatur zunimmt. Daher ist die Versteifung wahrscheinlich auf Veränderungen im Biofilm zurückzuführen.

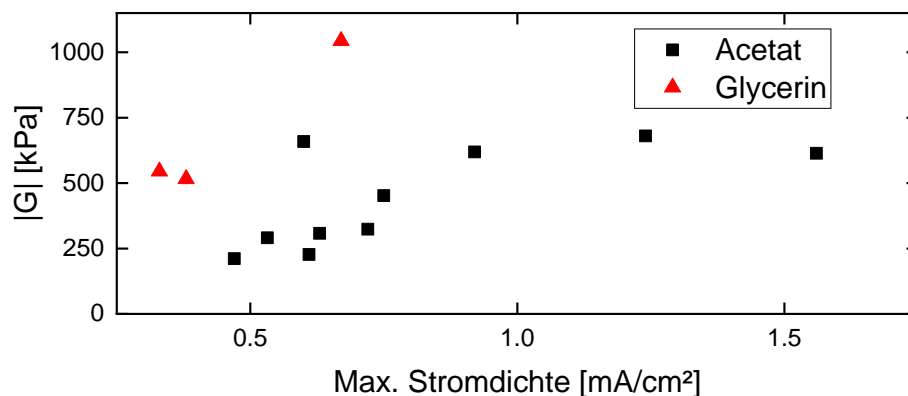


Abbildung 42: Entwicklung des maximalen Schermoduls in Abhängigkeit von der maximalen Stromdichte.

Die Biofilme, die mit Glycerin angezogen wurden sind, sind steifer als die Acetatbiofilme, obwohl deren maximale Stromdichte deutlich kleiner ist. Dies könnte an einer größeren Menge an nicht elektrochemisch aktiven Bakterien liegen. Deren Vorhandensein ist bei der Verwendung von Glycerin als alleiniger Kohlenstoffquelle notwendig, weil *Geobacter sulfurreducens* Glycerin nicht selbst verstoffwechseln kann. Er ist in diesem Fall auf andere Bakterien angewiesen, die das Glycerin in Acetat umwandeln.

### 5.4.5 Maximale Bandbreitenverschiebung und Pileffizienz

Ein Dicken-Scher-Resonator erfasst vor allem elektrodennahe Effekte. Besonders interessant ist der Oberton-unabhängige Anteil der Bandbreitenverschiebung (siehe Gleichung (43)). Dieser kann mit den leitfähigen Strukturen des Biofilms, den Pili, korreliert werden.

Abbildung 43 A zeigt die Temperaturabhängigkeit der Maximalwerte der Oberton-unabhängigen Bandbreitenverschiebung, die nach Gleichung (43) berechnet worden ist. Der Maximalwert für die Acetatbiofilme ist zwar verrauscht, aber mit  $(4862 \pm 575)$  Hz im Wesentlichen konstant und damit unabhängig von der Temperatur. Dies bedeutet, dass die Anzahl an Pili, die

## 5. Ergebnisse und Auswertung

von dem Biofilm ausgebildet werden, konstant ist und nicht von der Temperatur oder der maximalen Stromdichte beeinflusst wird. Die Streuung zeigt, dass es trotzdem noch eine große biologische Variabilität der Pildichte gibt. Der Maximalwert für die drei Glycerinbiofilme liegt etwas oberhalb des Mittelwertes der Acetatbiofilme. Die Abweichung ist jedoch nicht signifikant.

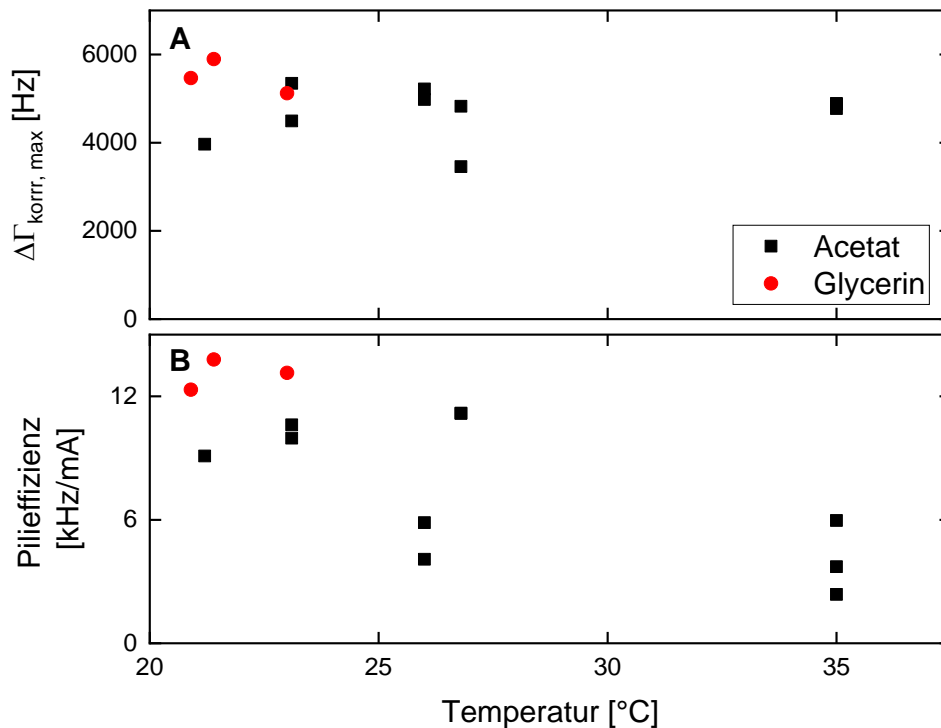


Abbildung 43: Temperaturabhängigkeit der maximalen, Oberton-unabhängigen Bandbreite (A), sowie der Pileffizienz (B) eines Dicken-Scher-Resonators.

Abbildung 43 B zeigt die Temperaturabhängigkeit der Pileffizienz (siehe Kap. 3.2.9) während der Anwuchsphase des Biofilms. Je niedriger die Temperatur ist, desto höher ist die Pileffizienz. Dies bedeutet, dass bei tieferen Temperaturen für den gleichen Strom eine höhere Pildichte notwendig ist. Da die Leitfähigkeit der Pili im betrachteten Bereich unabhängig von der Temperatur ist, müssen die intrazelluläre Prozesse von einer höheren Pildichte profitieren.<sup>[41]</sup>

### 5.5 Biofilmreaktion auf äußere Stressfaktoren

In diesem Kapitel wird die Reaktion des Biofilms auf äußere Einflüsse („Stress“) untersucht. Es ist bekannt, dass Biofilme auf Umwelteinflüsse reagieren um ungünstige Effekte abfedern zu können.<sup>[10]</sup> Zuerst wird das Verhalten bei Acetatmangel studiert. Anschließend wird

das Potential der Elektrode während einer Messung variiert. Zuletzt wurde die Reaktion auf Stress durch Antibiotika und Bakterizide untersucht.

### 5.5.1 Biofilmwachstum mit Acetatmangel

Acetat dient in der verwendeten Nährlösung als Kohlenstoffquelle und Energielieferant. Bei Acetatmangel können die Bakterien weder Energie erzeugen noch Biofilmmasse aufbauen. Die Reaktion des Biofilms auf den Acetatmangel wird in diesem Abschnitt untersucht.

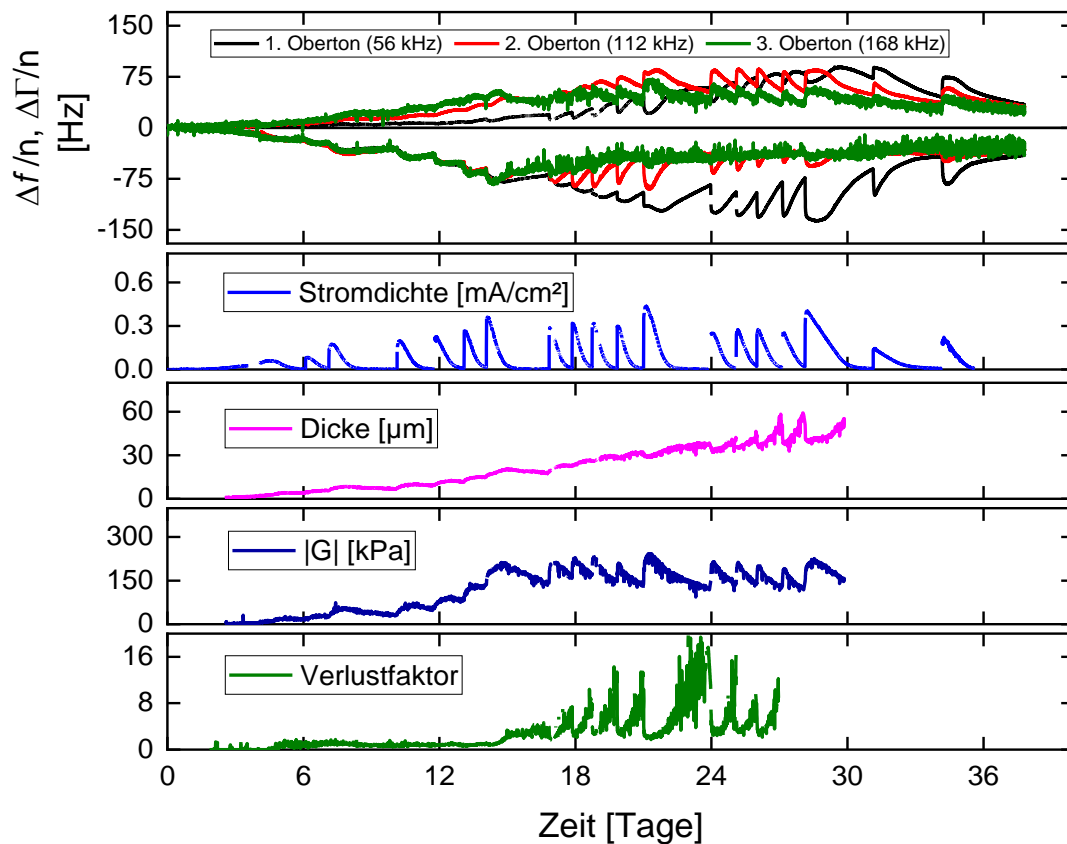


Abbildung 44: Biofilmwachstum bei portionsweiser Zugabe von Acetat. Zunächst werden 0.2 mM Acetat vorgelegt. Nachdem das Acetat aufgebraucht worden ist, wird neues Acetat (10 mg bzw. 30 mg vorm Wochenende) hinzugegeben.

Abbildung 44 zeigt das Biofilmwachstum auf einem Torsions-Resonator, bei dem das Acetat portionsweiser in kleinen Mengen (10 mg) zugegeben wurde, sodass sich acetatreiche Zeiten mit acetatarmen Zeiten abwechseln. Der Biofilm wächst auch unter diesen Bedingungen an.

Die Stromdichte wird in diesem Experiment im Wesentlichen durch die Acetatkonzentration kontrolliert. Sie steigt zunächst durch das Biofilmwachstum an. Allerdings wird das Acetat schnell aufgebraucht, sodass die Stromdichte wieder absinkt und auf beinahe null fällt. Nach

## 5. Ergebnisse und Auswertung

der Zugabe von neuem Acetat steigt die Stromdichte wieder innerhalb weniger Minuten an und das Biofilmwachstum setzt sich fort.

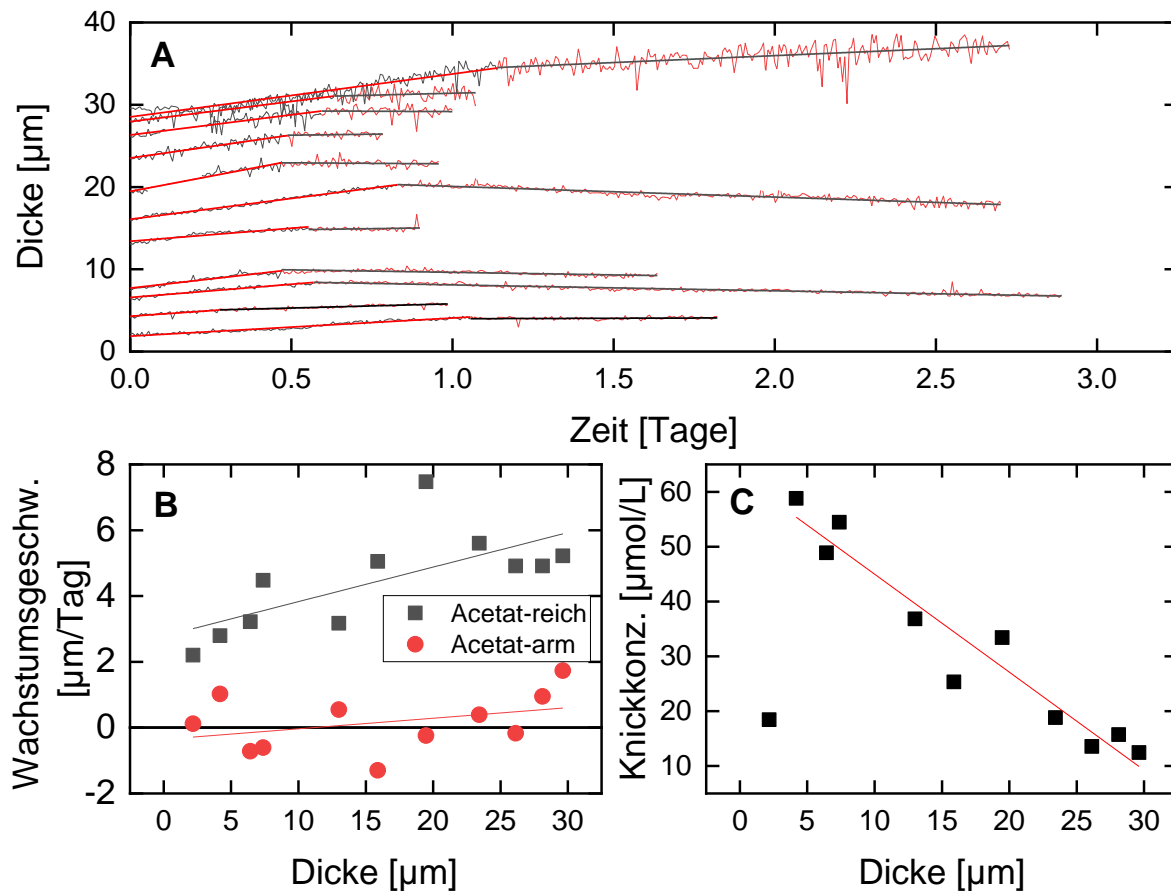


Abbildung 45: Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Acetatkonzentration. A: Entwicklung der Biofilmdicke nach einer Acetatzugabe: Es kommt zu einem Knick. Die Bereiche links und rechts des Knicks werden linear angenähert. B: Steigung der Geraden links (schwarz) und rechts (rot) vom Knick, C: Acetatkonzentration, bei der es zum Knick bei (A) kommt.

In acetatreichen Zeiten nimmt die Dicke des Biofilms zu, bis eine bestimmte Grenzkonzentration an Acetat erreicht wird. In diesem Bereich ändern die Bakterien schlagartig ihr Wachstumsverhalten, wodurch der Verlauf der Kurve der Biofilmdicke abknickt, wie in Abbildung 45 A dargestellt. Vor und nach dem Knick ist der Verlauf linear, sodass er gut durch eine Gerade angenähert werden kann. Die Steigungen dieser Geraden entsprechen Wachstumsgeschwindigkeiten und sind in Abbildung 45 B dargestellt. Je größer die Biofilmdicke ist, desto größer ist auch die Wachstumsgeschwindigkeit im acetatreichen Bereich (schwarze, eckige Punkte), weil jede Zelle über ihr Vermehrungsvermögen zum Biofilmwachstum beitragen kann. Das Verhalten der Wachstumsgeschwindigkeit unter acetatarmen Bedingungen ist uneinheitlich (rote, runde Punkte). Es schwankt um eine Wachstumsgeschwindigkeit von 0  $\mu\text{m}/\text{Tag}$ ,



sodass es sowohl zu einem Biofilmaufbau als auch zu einem Biofilmbau kommen kann. Allerdings sind die Auf- oder Abbaugeschwindigkeiten ( $\pm 1 \mu\text{m}/\text{Tag}$ ) im acetatarmen Bereich deutlich kleiner als die Aufbaugeschwindigkeit im acetatreichen Bereich ( $2\text{--}6 \mu\text{m}/\text{Tag}$ ).

Abbildung 45 C zeigt die kritische Acetatkonzentration, bei der es zum Knick kommt. Sie nimmt mit zunehmender Biofilmdicke ab und erreicht ihre Nullstelle bei ca.  $36 \mu\text{m}$ . Dies zeigt, dass die Effizienz, mit der die Biofilme das Acetat nutzen, mit steigender Biofilmdicke zunimmt. Sie bleiben bei immer kleineren Acetatkonzentrationen wachstumsfähig und wachstumswillig. Möglicherweise haben die gereiften Biofilme schon Nährstoffspeicher aufgebaut, von denen unter Acetatmangel gezehrt werden kann. Oberhalb einer Biofilmdicke von  $36 \mu\text{m}$  ändert sich das Verhalten des Biofilms grundlegend. In diesem Bereich kommt es auch unter acetatarmen Bedingungen zu einem deutlichen Anstieg der Biofilmdicke. Da unter acetatarmen Bedingungen kein Kohlenstoff für den Biofilmaufbau zur Verfügung steht, muss diese Veränderung der Biofilmdicke auf strukturelle Veränderungen wie z.B. ein Aufquellen des Biofilms zurückzuführen sein.

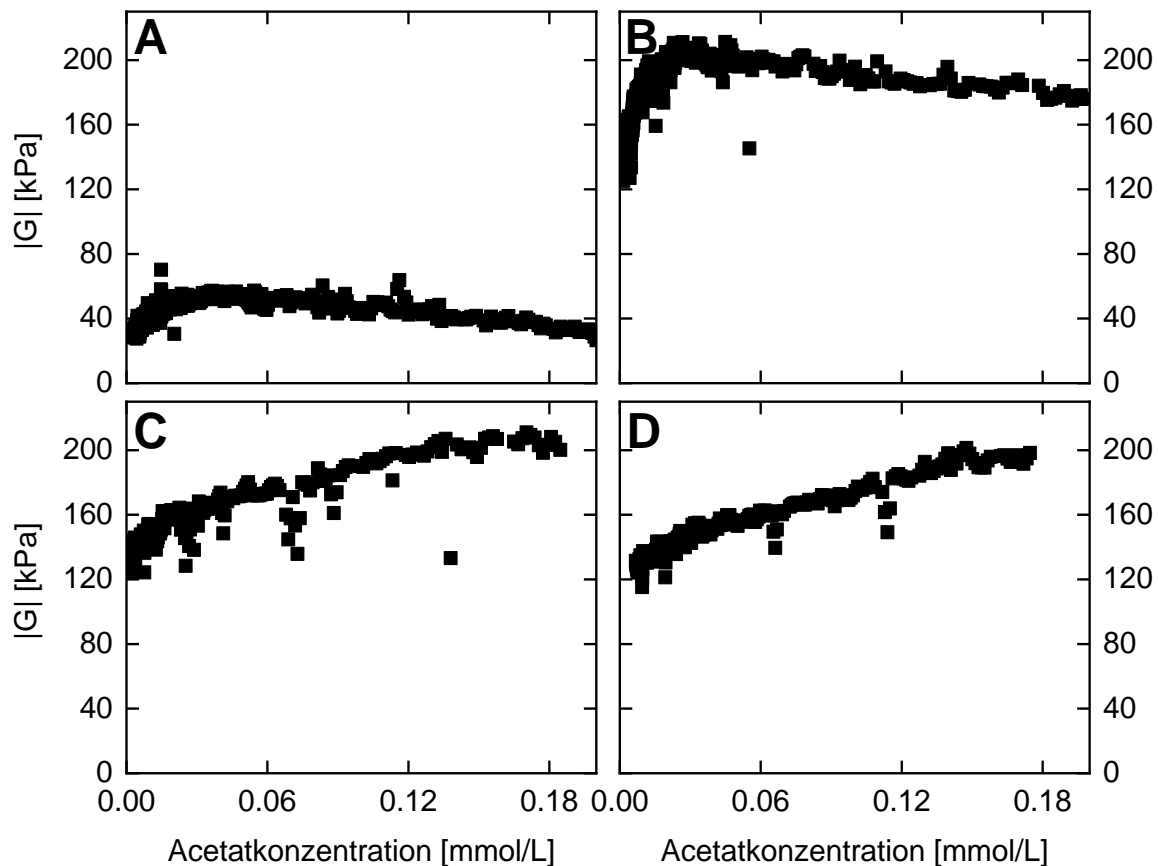


Abbildung 46: Abhängigkeit der Steifigkeit von der Acetatkonzentration für Biofilme mit verschiedenen Dicken (A:  $6 \mu\text{m}$ , B:  $15 \mu\text{m}$ , C:  $26 \mu\text{m}$ , D:  $35 \mu\text{m}$ ).

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Die Steifigkeit des Biofilms nimmt mit zunehmender Dicke ebenfalls zu (siehe Abbildung 44). Ab einer Dicke von ca. 20  $\mu\text{m}$  bleibt die Steifigkeit insgesamt konstant. Allerdings zeigt sich auch hier ein acetatabhängiges Verhalten. Dies ist in Abbildung 46 für vier verschiedene Zyklen dargestellt. Die Bilder A (6  $\mu\text{m}$ ) und B (15  $\mu\text{m}$ ) zeigen das Verhalten der Biofilmsteifigkeit, bevor die Steifigkeit ihr Plateau erreicht hat. In diesem Bereich dominiert die wachstumsbedingte Versteifung des Biofilms. Erst ab einer Acetatkonzentration von weniger als 30  $\mu\text{M}$  kommt es zu einer acetatbedingten Erweichung des Biofilms. Die Abbildungen C und D liegen innerhalb des Plateaus. In diesem Bereich gibt es keine wachstumsbedingte Versteifung mehr. Das Verhalten ist komplett von der Acetatkonzentration dominiert. Es zeigt sich, dass es unter dem Stress des Acetatmangels zu einer Erweichung des Biofilms kommt. Der Verlauf ist dabei annähernd linear mit einer Steigung von ca. 400 kPa/mM.

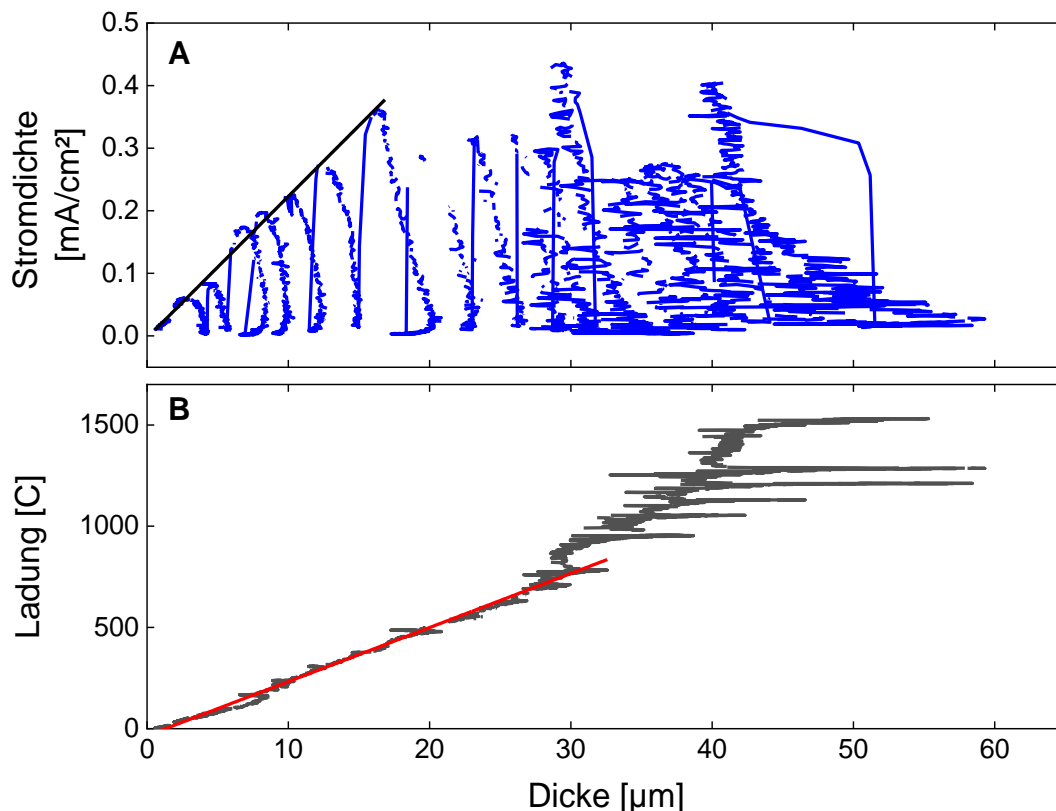


Abbildung 47: Stromdichte und Ladung in Abhängigkeit von der Biofilmdicke

Abbildung 47 A zeigt den Verlauf des Stroms und der Ladung in Abhängigkeit von der Dicke. Die Stromdichte wird in diesem Fall im Wesentlichen durch die Acetatkonzentration bestimmt. Bis zu einer Dicke von 20  $\mu\text{m}$  ist eine lineare Entwicklung der Peakstromdichten

erkennbar. In diesem Bereich ist die initiale Acetatkonzentration nach der Zugabe noch so groß, dass die Stromdichte nicht durch das Acetat begrenzt wird.

Abbildung 47 B zeigt die geflossene Ladungsmenge in Abhängigkeit von der Biofilmdicke. Bis zu einer Dicke von 30  $\mu\text{m}$  ist die Ladungsmenge in guter Näherung proportional zur Biofilmdicke. Die Faraday-Effizienz liegt in diesem Bereich bei 22.9  $\mu\text{g}/\text{C}$  und ist vergleichbar mit der von Biofilmen ohne Acetatverarmung. Das bedeutet, dass es zu einer reversiblen Unterbrechung des Wachstums bei Acetatmangel kommt, und der Biofilm normal weiterwächst, wenn neues Acetat vorhanden ist. Oberhalb von 30  $\mu\text{m}$  wächst der Biofilm zwar noch weiter, aber mit einer deutlich geringeren Wachstumsgeschwindigkeit. Die Faraday-Effizienz nimmt ab.

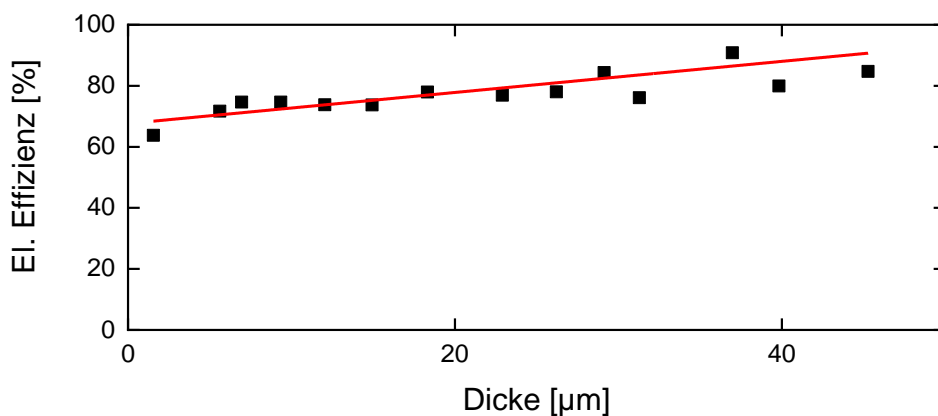


Abbildung 48: Abhängigkeit der elektrischen Effizienz von der Biofilmdicke

Aus der zugegebenen Acetatmenge und der bis zur nächsten Zugabe geflossenen Ladung kann eine elektrische Effizienz berechnet werden. In Abbildung 48 ist die so berechnete elektrische Effizienz in Abhängigkeit von der Biofilmdicke dargestellt. Die elektrische Effizienz nimmt mit zunehmender Dicke ebenfalls zu. Dieses Ergebnis passt zu den Ergebnissen von TANG *et al.*<sup>[52]</sup>

Abbildung 49 zeigt das Verhalten eines Biofilms auf einem Dicken-Scher-Resonator bei portionsweiser Zugabe von Acetat, sodass sich acetatreiche und acetatarme Zeiten abwechseln. Diese sukzessive Zugabe lässt sich gut an der Stromdichte ablesen. In acetatarmen Zeiten ist die Stromdichte klein, bei acetatreichen Zeiten ist die Stromdichte groß.

Das Signal des Dicken-Scher-Resonators ist zunächst vergleichbar mit dem in Kapitel 5.2.1 beschriebenen Verhalten. Die Bandbreite nimmt als wesentlicher Parameter mit dem Anwachsen des Biofilms zu und erreicht anschließend ein Plateau. Die Bandbreitenverschiebung ist zunächst unabhängig von der Obertonordnung, spaltet sich dann aber im Plateaubereich auf. In

## 5. Ergebnisse und Auswertung

diesem Bereich kommt es auch zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz. Im Vergleich zur Bandbreitenverschiebung bleibt diese jedoch klein.

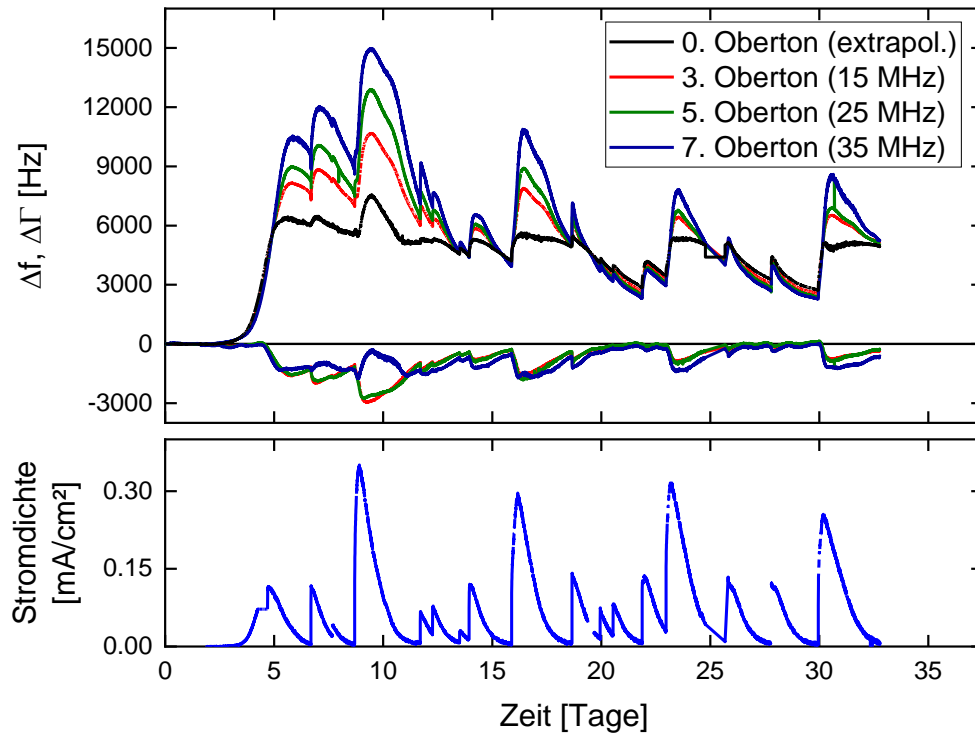


Abbildung 49: Wachstum eines Biofilms auf einem Dicken-Scher-Resonator bei portionsweiser Zugabe von Acetat.

Auf dem Plateau zeigt sich dann eine deutliche Abhängigkeit der Bandbreiten- und Frequenzverschiebung von der Acetatkonzentration. Wenn die Acetatkonzentration groß ist, der Biofilm also nicht hungert, dann steigt auch die Bandbreite, wobei primär der Oberton-abhängige Anteil ansteigt, während der Oberton-unabhängige Anteil der Bandbreitenverschiebung zunächst näherungsweise konstant bleibt. Die bedeutet, dass die Pilidichte konstant bleibt und sich nur die EPS des Biofilms ändert. Dieses Verhalten setzt sich bis zum 15. Tag fort. Nach dem 15. Tag hebt sich die Aufspaltung auf und der Oberton-unabhängige Anteil der Bandbreitenverschiebung beginnt zu sinken. Es werden folglich auch Pili abgebaut. Nach jeder Acetatzugabe nimmt die Bandbreitenverschiebung aber wieder zu und die Pilidichte steigt an.

Das Verhalten der Frequenzverschiebung ist etwas ungewöhnlich. Sie nimmt bis zum 5. Oberton ab und ab dem 7. Oberton zu. Ansonsten Verläuft sie im Wesentlichen proportional zum Oberton-abhängigen Anteil der Bandbreitenverschiebung. Die Messung mit dem Torsions-Resonator zeigt, dass der Biofilm weicher wird, wenn er hungert. In dieses Bild fügen sich auch die Ergebnisse mit dem Dicken-Scher-Resonator ein. Dabei muss beachtet werden,

das die Scherwelle des Dicken-Scher-Resonators im Plateaubereich komplett im Biofilm dissipiert. Eine Erweichung des Biofilms reduziert die Eindringtiefe der Scherwelle, was wiederum die Dissipation verringert und daher die Bandbreite sinken lässt.

### 5.5.2 Biofilmwachstum mit variablen Potentialen

In diesem Abschnitt wird die Reaktion des Biofilms auf Potentialwechsel und das Verhalten bei unterschiedlichen Potentialen untersucht. *Geobacter sulfurreducens* benötigt für seinen Metabolismus einen Elektronenakzeptor mit passendem Potential. Das Standardpotential für den Acetatabbau zu  $\text{CO}_2$  liegt bei Anaerobiern bei  $-534 \text{ mV vs. SCE}$ .<sup>[98]</sup> Dies ist das minimale Potential, das benötigt wird. Liegt das Potential der Elektrode unter diesem Wert, kann kein Elektron mehr an die Elektrode abgegeben werden und der Zellstoffwechsel kommt zum Erliegen.

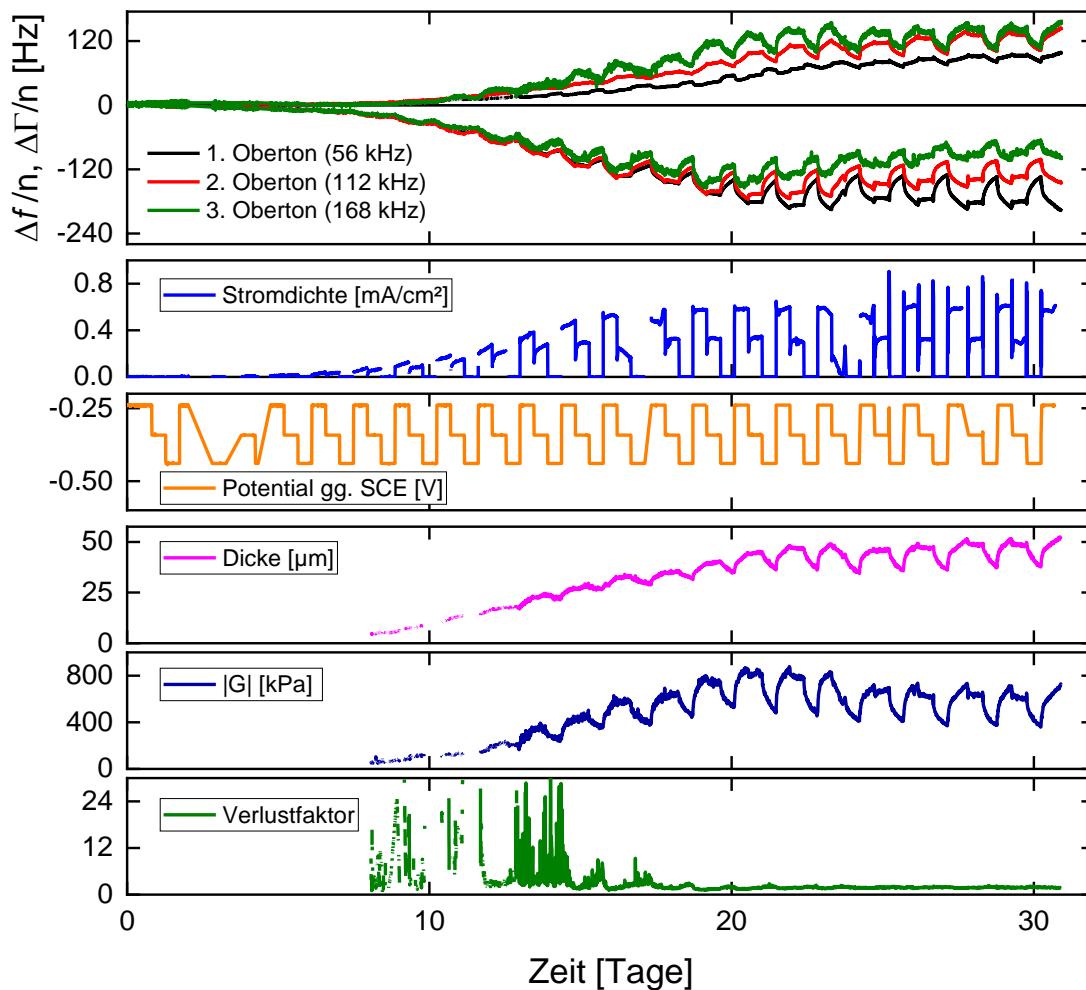


Abbildung 50: Biofilmwachstum bei wechselnden Potentialen ( $-241 \text{ mV}$ ,  $-341 \text{ mV}$ ,  $-441 \text{ mV}$  gg. SCE) der Arbeitselektrode.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Abbildung 50 zeigt das Biofilmwachstum auf einem Torsions-Resonator. Während des Wachstums wurde das Potential regelmäßig gewechselt. Als erstes Potential wurde  $-241\text{ mV vs. SCE}$  gewählt. Bei diesem Wert schränkt das Potential den Biofilm nicht ein. Als mittleres Potential wurde  $-341\text{ mV vs. SCE}$  gewählt. Dieses Potential ist nicht mehr ideal, aber Wachstum ist noch möglich. Als drittes Potential wurde  $-441\text{ mV vs. SCE}$  gewählt. Unter diesen Bedingungen ist das Wachstum gerade noch möglich. Jedes Potential wird für jeweils elf Stunden konstant an der Arbeitselektrode angelegt.

Der Biofilm wächst unter diesen Bedingungen an. Sowohl Biofilmdicke als auch Biofilmsteifigkeit steigen mit der Zeit an und erreichen nach ca. 20 Tagen ein Plateau. Allerdings ändert sich sowohl die Wachstumsrate als auch die Versteifungsrate nach jedem Potentialwechsel. Da die Änderung zwischen den Potentialen näherungsweise konstant ist, kann sie durch einen linearen Fit angepasst werden. Die Steigungen für die jeweiligen Segmente zwischen den Potentialen sind in Abbildung 51 aufgeführt.

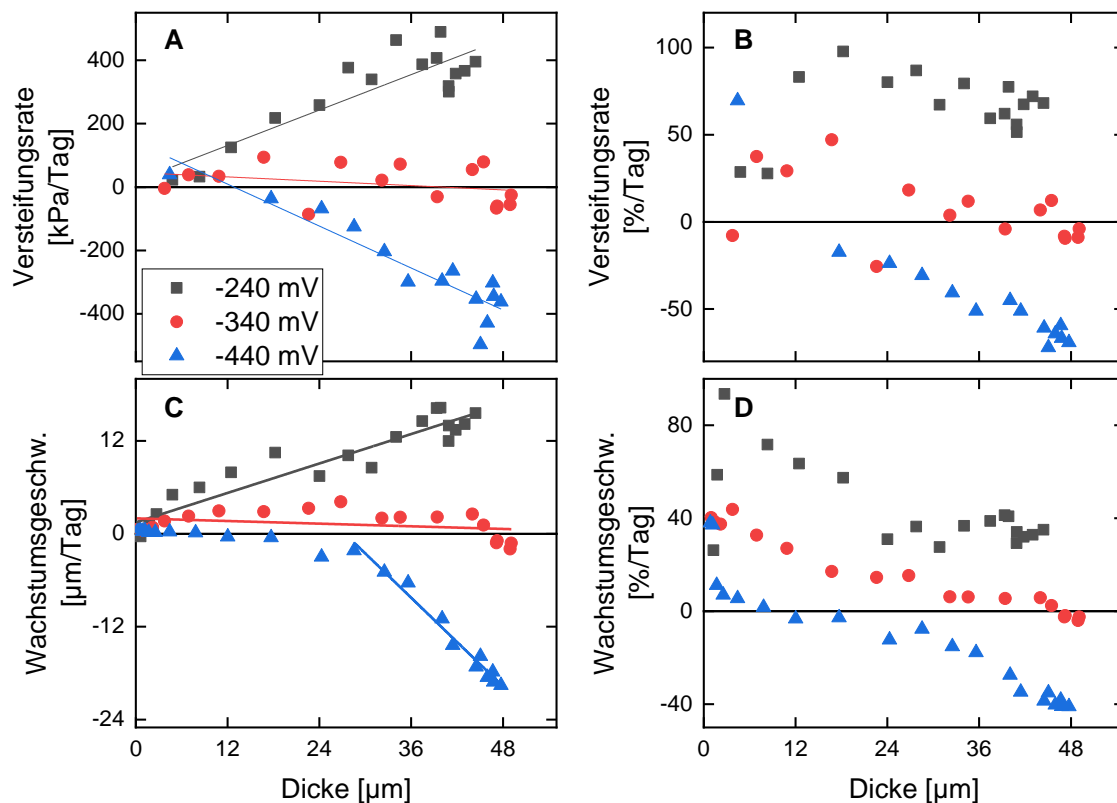


Abbildung 51: Einfluss des Potentials auf die Versteifungs- (A, B) und Wachstumsrate (C, D). Die Raten wurden linear in den Segmenten zwischen den Potentialwechseln angenähert.

Abbildung 51 A zeigt die Versteifungsrate für die unterschiedlichen Potentiale gegen die Biofilmdicke. Für ein Potential von  $-241\text{ mV gg. SCE}$  ist die Versteifungsrate immer positiv. Die absolute Wert nimmt näherungsweise mit der Biofilmdicke zu. Bei  $-341\text{ mV gg. SCE}$  gibt es keine Vorzugrichtung. Die Versteifungsrate pendelt zwischen positiven und negativen Werten hin und her. Bei  $-441\text{ mV gg. SCE}$  ist nur der erste Wert größer als null. Für dickere Filme ist die Versteifungsrate negativ – der Biofilm wird weicher. Eine Erweichung des Biofilms unter Stress konnte auch schon in Kap. 5.5.1 beobachtet werden.

Abbildung 51 B zeigt die relative Versteifungsrate. Bei einem Potential von  $-241\text{ mV gg. SCE}$  und  $-341\text{ mV gg. SCE}$  durchläuft die relative Versteifungsrate bei einer Biofilmdicke von  $18\text{ }\mu\text{m}$  ein Maximum und fällt danach wieder ab.

Abbildung 51 C zeigt die absolute Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Biofilmdicke und dem Potential. Für das positivste Potential ist die Wachstumsgeschwindigkeit durchgehend positiv – der Biofilm wächst. Die absolute Wachstumsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Dicke näherungsweise linear zu. Bei einem Potential von  $-341\text{ mV gg. SCE}$  steigt die Wachstumsgeschwindigkeit zunächst an, bleibt jedoch ab einer Dicke von ca.  $10\text{ }\mu\text{m}$  näherungsweise konstant. Ab einer Dicke von  $30\text{ }\mu\text{m}$  nimmt sie ab, bleibt aber zunächst noch positiv bis zu einer Dicke von ca.  $40\text{ }\mu\text{m}$ . Oberhalb dieser Dicke ist die Wachstumsgeschwindigkeit negativ – der Biofilm baut sich ab. Bei dem negativsten Potential ( $-441\text{ mV}$ ) ist die Wachstumsgeschwindigkeit bis zu einer Dicke von  $20\text{ }\mu\text{m}$  beinahe null. Oberhalb dieser Dicke wird die Wachstumsgeschwindigkeit negativ. Ab einer Dicke von  $30\text{ }\mu\text{m}$  fällt sie linear mit der Dicke ab – der Biofilm löst sich auf.

Abbildung 51 D zeigt im Vergleich zu Abbildung 51 C die relative Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Biofilmdicke für die verschiedenen Potentiale. In der Initialisierungsphase bis zu einer Biofilmdicke von  $6\text{ }\mu\text{m}$  steigt die relative Wachstumsgeschwindigkeit an. Bei einem Potential von  $-241\text{ mV gg. SCE}$  ist dieser Anstieg besonders stark ausgeprägt. Oberhalb einer Dicke von  $6\text{ }\mu\text{m}$  ist der relative Verlauf der Kurven für alle drei Potentiale ähnlich. Die relative Wachstumsgeschwindigkeit fällt zunächst ab, bleibt dann in einem gewissen Bereich näherungsweise konstant, um ab einer bestimmten Dicke wieder abzufallen. Die einzelnen Kurven werden durch ein positiveres Potential zu größeren Wachstumsgeschwindigkeiten und zu größeren Dicken verschoben. So erreicht die Kurve für  $241\text{ mV gg. SCE}$  ihr Plateau bei einer Biofilmdicke von  $24\text{ }\mu\text{m}$ , während die Kurve für  $-441\text{ mV gg. SCE}$  ihr Plateau bereits bei einer Dicke von  $10\text{ }\mu\text{m}$  erreicht.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Eine Auflösung des Biofilms konnte in Kap. 5.5.1 nicht beobachtet werden. Dies zeigt, dass der Biofilm in diesem Fall anders reagiert als unter Acetatmangel. Wahrscheinlich erkennen die Bakterien, dass sie auf der Elektrode bei einem zu negativen Potential nicht mehr lebensfähig sind und lösen sich von der Elektrode ab. Ein Restbiofilm bleibt trotzdem noch erhalten. Dieses Verhalten konnte auch schon in Kap. 5.3.4 beobachtet werden. Auch hier kam es zu einer Begrenzung der Biofilmdicke unter ungünstigen Potentialen. Dort verblieben sie allerdings bei einer maximalen Dicke von 10  $\mu\text{m}$ . Anscheinend hat sich der regelmäßige Potentialwechsel stimulierend auf das Wachstum ausgewirkt.

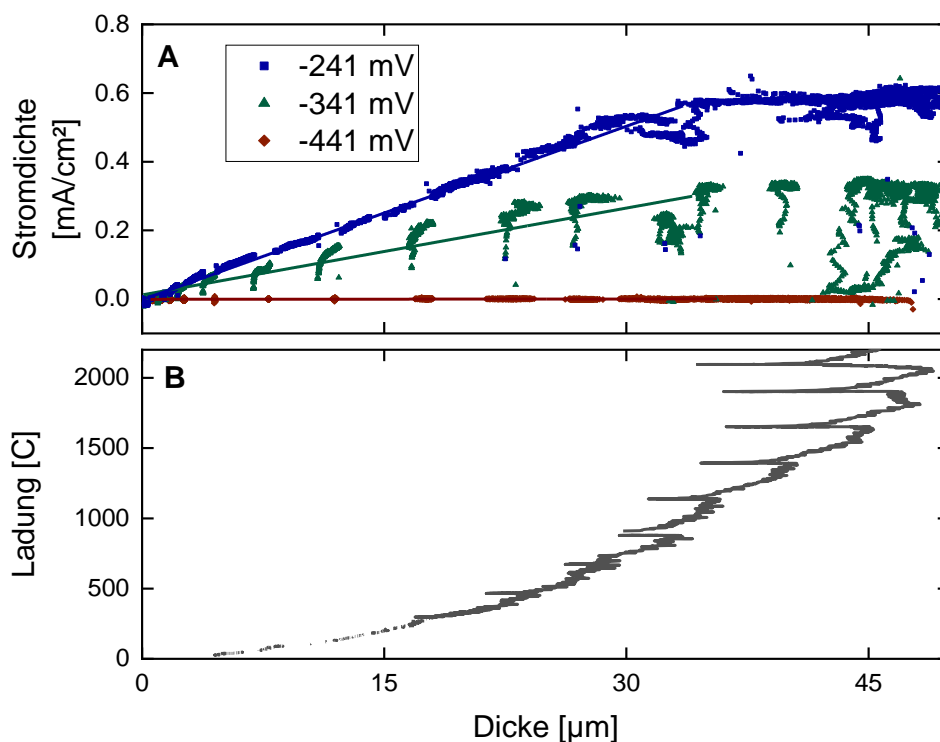


Abbildung 52: Abhängigkeit der Stromdichte und der Ladung von der Biofilmdicke bei unterschiedlichen Potentialen.

Abbildung 52 A zeigt die Entwicklung des Stroms in Abhängigkeit von der Biofilmdicke und dem Potential. Bei einem Potential von  $-240\text{ mV}$  nimmt die Stromdichte bis zu einer Dicke von 30  $\mu\text{m}$  linear mit der Dicke zu. Oberhalb von 30  $\mu\text{m}$  bleibt sie konstant. Die Stromeffizienz ist mit  $168\text{ }\mu\text{A}/\text{mm}^3$  deutlich kleiner als bei normalen Acetatbiofilmen. Bei  $-340\text{ mV}$  zeigt sich ein vergleichbarer Verlauf, allerdings ist die Steigung nur halb so groß wie  $-240\text{ mV}$ . Bei  $-440\text{ mV}$  bleibt die Stromdichte auf einem konstanten Wert knapp über 0  $\text{mA}/\text{cm}^2$ . Während die Stromdichte nach dem Wechsel von  $-440\text{ mV}$  zu  $-240\text{ mV}$  beinahe sofort ihren Maximalstrom erreicht, dauert dies nach dem Wechsel von  $-240\text{ mV}$  zu  $-340\text{ mV}$  ca. eine Stunde.



Dieses Verhalten zeigt, dass sich der Biofilm an ein Potential von  $-240\text{ mV}$  angepasst hat. Nach dem Wechsel auf  $-340\text{ mV}$  muss er sich erst wieder an das neue Potential anpassen.

Abbildung 52 B zeigt den Verlauf der Ladung gegen die Biofilmdicke. In den vorherigen Experimenten war dieser Zusammenhang häufig linear. Dies trifft auf diesen Biofilm nicht mehr zu. Der Grund hierfür ist, dass es zu Auflösungserscheinungen kommt (vgl. Abbildung 51), welche das Faraday-artige Wachstum des Biofilms stören.

### 5.5.3 Biofilmreaktion auf ein freies Potential

Für das verwendete Einkammersystem ist die Benutzung eines Potentiostaten unerlässlich, da die Wasserstoffreduktion an der Gegenelektrode zu keinem Potential an der Arbeitselektrode führt, unter dem *Geobacter sulfurreducens* lebensfähig ist. Wird der Potentiostat nach einer Wachstumsphase von der Arbeitselektrode getrennt, stellt sich wieder ein für *Geobacter sulfurreducens* ungünstiges Gleichgewichtspotential ein.

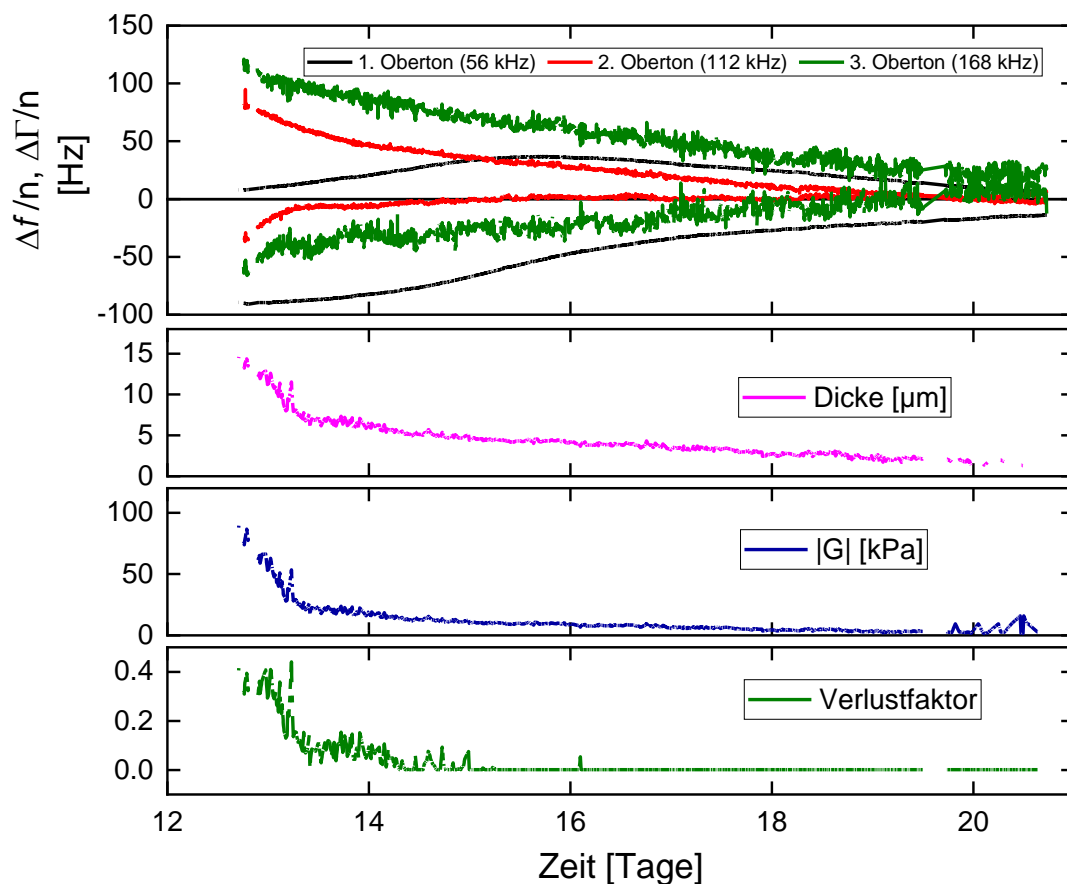


Abbildung 53: Verhalten des Biofilms ohne angelegtes Potential.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Abbildung 53 zeigt das Verhalten eines ca. 15  $\mu\text{m}$  dicken Biofilms, der vom Potentiostaten getrennt wurden ist, sodass an der Arbeitselektrode kein Potential angelegt wird. Dadurch verschiebt sich das Potential der Arbeitselektrode in einer Weise, dass die Redoxsysteme von *Geobacter sulfurreducens* durch die Anode nicht mehr reduziert werden können. Dadurch kommen der Acetatabbau und die Energiegewinnung in den Zellen zum Erliegen. Die Bakterien erkennen, dass die Bedingungen auf der Elektrode für sie nun nicht mehr günstig sind und lösen als Reaktion den Biofilm auf. Nach etwa einem Tag hat sich die Dicke von 15  $\mu\text{m}$  auf 5  $\mu\text{m}$  reduziert und der Schermodul ist von 80 kPa auf 25 kPa abgefallen. Danach verlangsamt sich die Auflösung des Biofilms deutlich. Es dauert weitere sechs Tage bis die Dicke auf 2  $\mu\text{m}$  abgefallen ist. Eine Auswertung des Schermoduls ist in diesem Bereich nur noch schlecht möglich, weil die Verschiebungen in diesem Bereich klein und daher stark fehlerbehaftet sind. Es scheint jedoch so zu sein, dass ein Restbiofilm beständig auf der Oberfläche verbleibt. Es könnte sich dabei primär um EPS handeln, die nach dem Weggang der Bakterien auf der Oberfläche verbleiben.

### 5.5.4 Wirkung des Bakterizids Chloramin B

Chloramin B ist ein Bakterizid aus der Klasse Sulfonamide. Diese wirken antimikrobiell, weil sie eine strukturelle Ähnlichkeit zur *p*-Aminobenzoesäure besitzen. Diese Verbindung ist essentiell für die Folsäureproduktion in Bakterien. Sulfonamide stören diese Produktion.<sup>[99]</sup> Des Weiteren ist die N–Cl Bindung instabil. Sie hydrolysiert unter Bildung von Hypochlorit, dass durch seine oxidierende Wirkung antibakteriell wirksam ist.

Abbildung 54 zeigt die Wirkung des Bakterizids Chloramin B auf zwei verschiedene Biofilme (A und B). Beide Biofilme wurden zunächst unter Standardbedingungen auf dem Torsions-Resonator bis zu einer Dicke von 15  $\mu\text{m}$  (A) bzw. 20  $\mu\text{m}$  (B) angezogen. Danach wurde zu beiden Nährmedien portionsweise Chloramin B gegeben. Bei Biofilm A erfolgte die Zugabe in wenigen, großen Portionen. Nach der ersten Zugabe bleibt der Strom konstant. Die Steifigkeit und die Dicke nehmen zunächst leicht zu. Nach einer weiteren Zugabe zeigt sich eine kleine, aber deutliche Reaktion in der Stromdichte. Diese fällt ab, stabilisiert sich aber auf einem niedrigeren Niveau. Auch die Steifigkeit und die Dicke beginnen zu fallen, erreichen allerdings beide in der betrachteten Zeit keinen stabilen Zustand. Nach der dritten Zugabe von Chloramin B fällt der Strom innerhalb von einer Stunde auf unter null ab. Dies deutet darauf hin, dass alle Bakterien durch das Chloramin B getötet worden sind. Die Biofilmdicke fällt weiter ab, stabilisiert sich jedoch bei einer Dicke von ca. 5  $\mu\text{m}$ . Auch die Steifigkeit fällt weiter

ab und stabilisiert sich bei 15 kPa. Nach der Behandlung bleibt ein sehr weicher, metabolisch inaktiver Biofilm zurück.

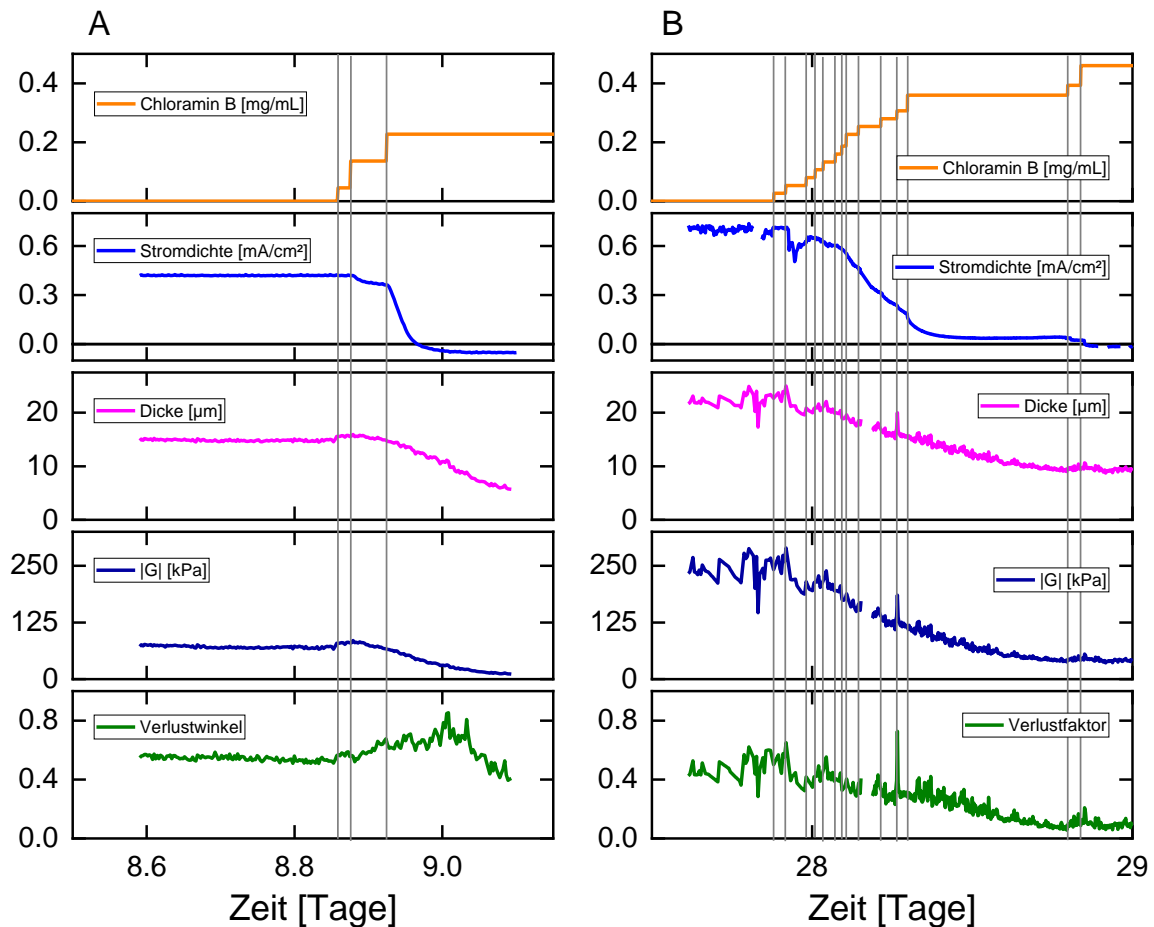


Abbildung 54: Wirkung des Bakterizids Chloramin B auf zwei verschiedene Biofilme. Bei Biofilm A erfolgt die Zugabe in drei große Schritten. Bei Biofilm B erfolgte die Chloramin B Zugabe hingegen in kleinen Schritten

Abbildung 54 B zeigt ein ähnliches Experiment. Zunächst wurde der Biofilm bis zu einer Dicke von 20  $\mu\text{m}$  angezogen. Dann wurde das Chloramin im Vergleich zu A) in kleineren Portionen im Verlauf von 24 Stunden hinzugegeben. Die ersten beiden Zugaben von Chloramin B zeigen keinen Einfluss auf den Biofilm. Nach der dritten Zugabe beginnt der Biofilm weicher zu werden und die Biofilmdicke nimmt kontinuierlich ab. Die Stromdichte sinkt nur langsam. Dies ändert sich nach der siebten Zugabe. Ab dieser fällt der Strom deutlich schneller ab bis er null erreicht. Die Stromdichte reagiert auf jede Zugabe von Chloramin. Direkt nach der Zugabe fällt der Strom stärker ab und flacht dann wieder ab. Die Änderungen in der Dicke und der Steifigkeit werden durch die weiteren Zugaben nicht beeinflusst. Zum Schluss fällt die Stromdichte auf null ab. Die Dicke stabilisiert sich bei einem Wert von 10  $\mu\text{m}$ . Die Steifigkeit bleibt bei 40 kPa konstant.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

In Beiden Fällen kommt es zu einer Inaktivierung des Biofilms bei ausreichender Bakterizidkonzentration. Die Stromdichte reagiert schneller auf Änderungen als die mechanischen Eigenschaften des Biofilms, für die erst eine minimale Konzentration an Chloramin B vorhanden sein muss. Ist der Schwellenwert überschritten, verändern sich der Biofilm unabhängig von der Bakterizidkonzentration. Der Biofilm wird dabei vom Chlormain B nicht komplett aufgelöst. Ein weicher Rest blieb immer übrig.

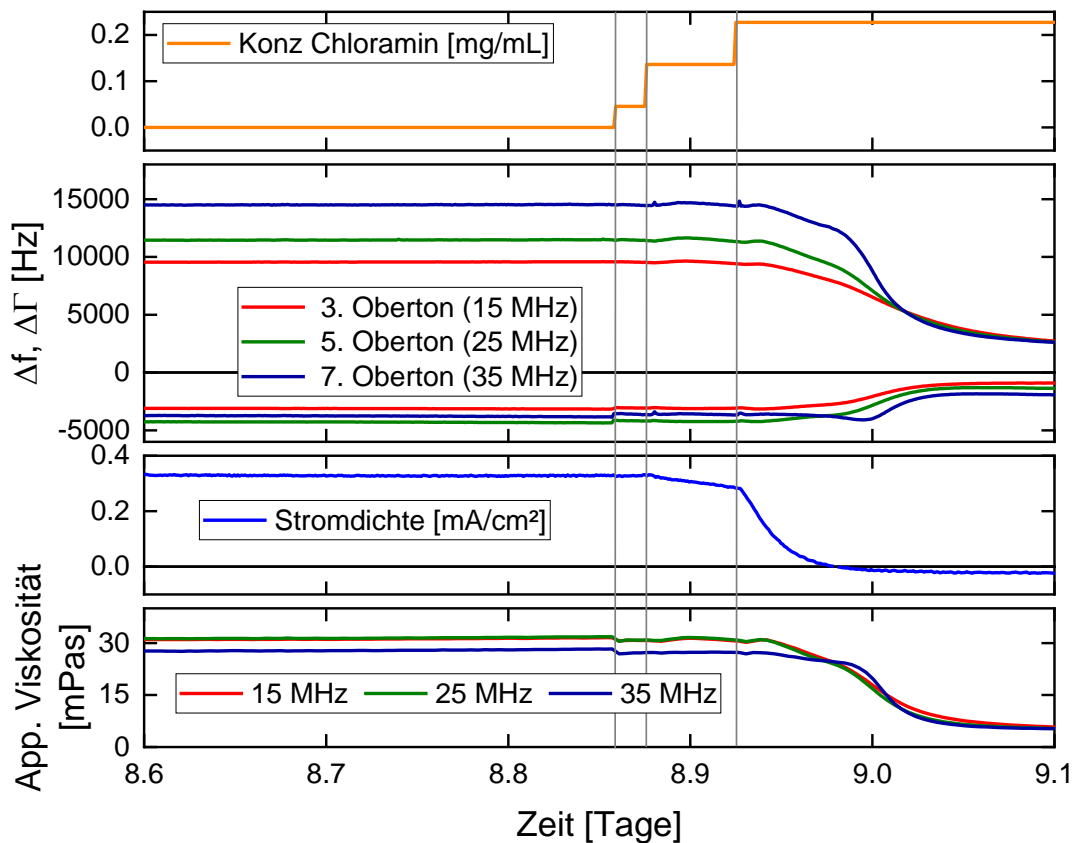


Abbildung 55: Wirkung des Bakterizids Chlormain B auf einen Biofilm untersucht mit einem Dicken-Scher-Resonator. Die Untersuchung fand zusammen mit dem Biofilm aus Abbildung 54 A statt.

Abbildung 55 zeigt die Wirkung des Bakterizids Chloramin B auf einen Biofilm, der auf einem Dicken-Scher-Resonator angewachsen ist. Das Verhalten der Stromdichte ist vergleichbar mit Abbildung 54 A. Die erste Zugabe von Chloramin B beeinflusst die Stromdichte nicht. Nach der zweiten Portion Chloramin B kommt es zu einem leichten Abfall der Stromdichte. Nach der dritten Zugabe fällt die Stromdichte auf unter null ab.

Die Bandbreitenverschiebung wird durch die ersten Zugaben von Chloramin B nicht beeinflusst. Erst nach der dritten Zugabe fällt die Bandbreitenverschiebung ab, stabilisiert sich allerdings auf einem Niveau von 2400 Hz. Die Obertonabhängigkeit der Bandbreitenverschiebung

verliert ihre Aufspaltung und ist auf dem Plateau wieder unabhängig von der Obertonordnung. Dies entspricht dem Verhalten eines wachsenden Biofilms rückwärts betrachtet (Vgl. Kap. 5.3.1).

Die Frequenzverschiebung verhält sich vergleichbar zur Bandbreitenverschiebung. Sie bleibt durch die ersten beiden Zugaben von Chloramin zunächst unbeeinflusst. Erst nach der dritten Zugabe beginnt auch die Frequenzverschiebung sich null anzunähern. Allerdings stabilisiert auch sie sich auf einem konstanten Niveau.

Die apparente Viskosität ähnelt in ihrem Verlauf sehr der Bandbreitenverschiebung. Erst nach der dritten Zugabe von Chloramin zeigt sich ein deutlicher Effekt. Damit fällt die Viskosität später ab als die Steifigkeit des gesamten Biofilms (siehe Abbildung 54 A).

Es konnte gezeigt werden, dass auch ein Dicken-Scher-Resonator die Wirkung des Bakterizids detektieren kann. Die Reaktion erfolgt jedoch im Vergleich zum Torsions-Resonator verspätet. Dies ist auch verständlich, weil zunächst der äußere Biofilm von dem Chloramin B angegriffen wird. Der Dicken-Scher-Resonator erreicht jedoch nur den inneren Bereich des Biofilms, während der Torsions-Resonator auch die äußeren Bereiche erfassen kann.

Im Rahmen seiner Bachelorarbeit hatte Kuangjie Liu mit Bakterizid behandelte Biofilme mikroskopisch untersucht um zu überprüfen, ob diese Veränderungen auch optisch erkennbar sind. Allerdings konnte bis auf die Reduzierung der charakteristischen Länge des Biofilms keine optischen Veränderung festgestellt werden.<sup>[90]</sup> Dies bestätigt die Beobachtung, dass der Biofilm nicht komplett durch das Chloramin B aufgelöst wird. Stattdessen verbleibt ein Rest auf der Oberfläche.

### 5.5.5 Zugabe von Antibiotika und Quecksilber

Es wurde ebenfalls der Einfluss von Antibiotika (Sulfadiazin und Sulfamethoxazol) und von Quecksilber (in der Form von  $\text{HgCl}_2$ ) untersucht. Es ist bekannt, dass die Stromdichte von diesen Substanzen kaum beeinflusst wird.<sup>[100]</sup> In allen Fällen konnte kein Einfluss auf den Biofilm beobachtet werden. Es war dabei auch unerheblich, ob die Substanz bereits in der Nährlösung vorlag oder erst nach der Ausbildung des Biofilms hinzugegeben worden ist. Die einzige Beobachtung war, dass sich bei der Zugabe von Quecksilberchlorid mit der Zeit ein schwarzer Niederschlag bildet, der vermutlich aus Quecksilbersulfid besteht.

## 5.6 Cyclovoltammetrie an Biofilmen auf Schwingquarzen

### 5.6.1 Cyclovoltammetrie mit Torsions-Resonatoren

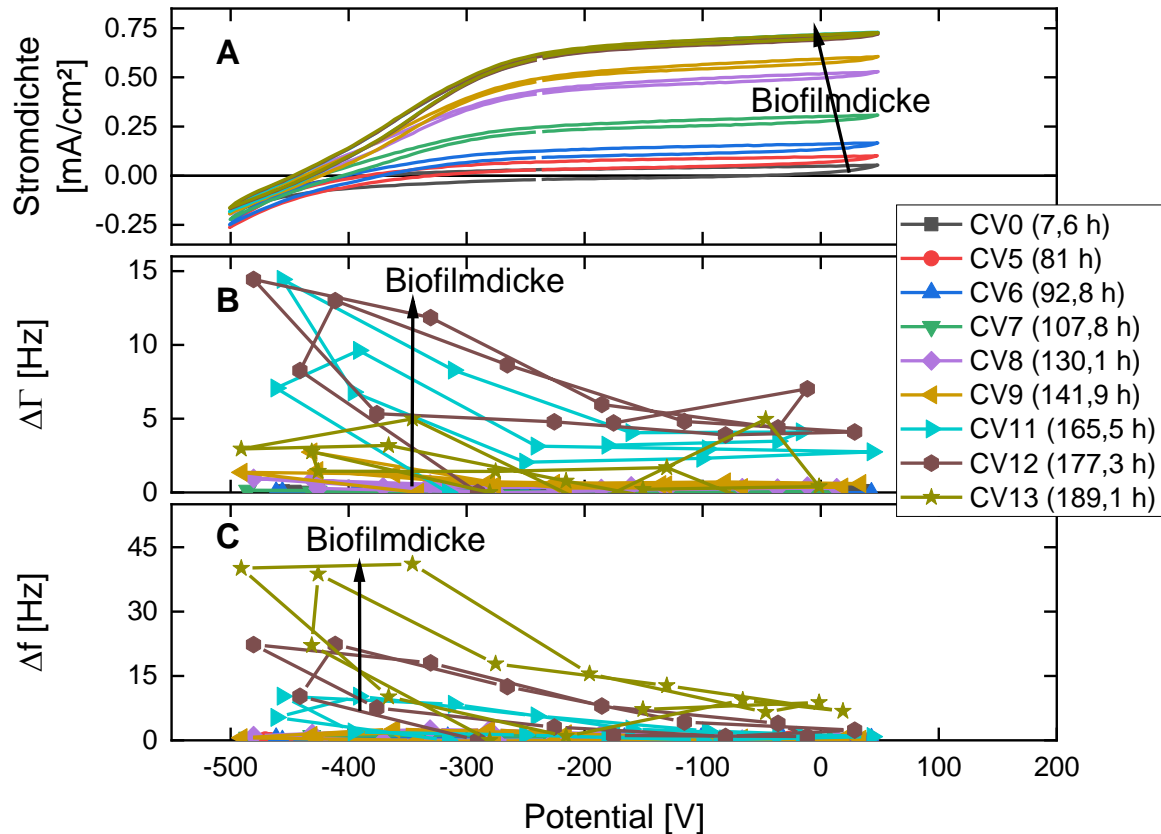


Abbildung 56: Cyclovoltammogramme eines wachsenden Biofilms auf einem Torsions-Resonator. Die Aufnahme erfolgte mit einer Rampengeschwindigkeit von 1 mV/s. A) Spannungs-Stromdichte Diagramm. B) u. C) Änderung der Bandbreite bzw. der Resonanzfrequenz des Grundtons während eines Cyclovoltammogramms. Der Startwert des Zyklus wird als Referenzwert für die Verschiebung verwendet.

Abbildung 56 zeigt ein Cyclovoltammogramm (CV) eines wachsenden Biofilms auf einem Torsions-Resonator. Es wurden zwei Zyklen in einem Potentialbereich von  $-500$  mV gg. SCE bis  $50$  mV gg. SCE mit einem Startpotential von  $-240$  mV gg. SCE aufgenommen. Die Vorschubgeschwindigkeit lag bei  $1$  mV/s. Im Diagramm A) ist die Abhängigkeit der Stromdichte vom Potential für Biofilme mit unterschiedlichen Dicken dargestellt. Bei Potentialen größer als  $-250$  mV gg. SCE ist die Stromdichte näherungsweise konstant. Mit steigender Biofilmdicke nimmt der Plateauwert der Stromdichte zu. Biofilme, bei denen der Plateauwert der Stromdichte wieder sinkt, sind aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt. In diesem Bereich ist der Bakterienmetabolismus oder die Stofftransporte geschwindigkeitsbestimmend. Unterhalb eines Potentials von  $-250$  mV gg. SCE fällt die Stromdichte beinahe linear ab. In diesem Bereich ist

das Oxidationsvermögen der Elektrode strombegrenzend. Die Redoxpotentiale der für den Ladungstransport verantwortlichen Cytochrome c liegen in diesem Bereich (–350 bis –450 mV).<sup>[56]</sup> Ab einem Potential von ca. –410 mV wird die Stromdichte negativ. Der negative Strom wird auch in einem System ohne Biofilm beobachtet. Er stammt von der Wasserzersetzung an den Elektroden.



Abbildung 56 B und C zeigen die Bandbreiten- und die Frequenzverschiebung während eines Cyclovoltammogramms. In beiden Fällen ist nur der 1. Oberton aufgetragen, da das Rauschen auf den höheren Obertönen zu stark ist. Deswegen ist auch keine qualitative Auswertung mittels Anpassung des viskoelastischen Modells (siehe Kap. 4.3.2) möglich. Die Verschiebungen des ersten Messpunktes bei –240 mV wurde als Referenzwert für die Betrachtung gewählt. Für junge und dünne Biofilme zeigen sowohl die Bandbreite als auch die Frequenz keine Reaktion auf das CV. Erst bei gereiften Biofilmen zeigt sich ein Effekt. Sowohl die Resonanzfrequenz als auch die Bandbreite nehmen zu. Dies kann als eine Zunahme der Weichheit des Biofilms interpretiert werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen aus Kap. 5.5.2. Auch hier kam es zu einer Erweichung, wenn das Oxidationspotential der Anode ungünstig für die Zellen wurde.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

### 5.6.2 Cyclovoltammetrie mit Dicken-Scher-Resonatoren

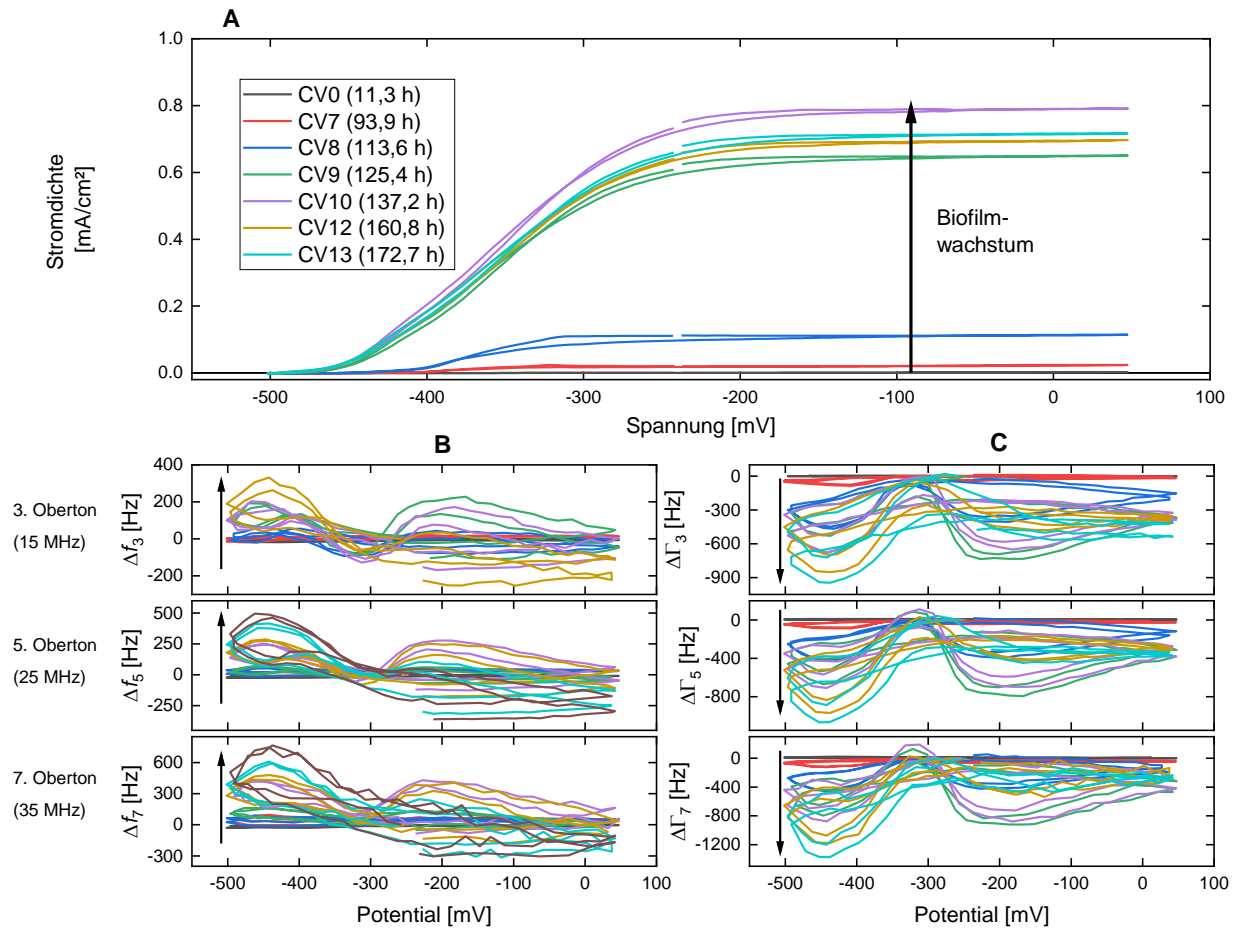


Abbildung 57: A: Cyclovoltammogramm eines wachsenden Biofilms auf einem Dicken-Scher-Resonator. B: Frequenzverschiebungen auf dem 3., 5. und 7. Oberton. C: Stromdichten. C: Bandbreitenverschiebungen auf dem 3. (15 MHz), 5. (25 MHz), und 7. (35 MHz) Oberton

Abbildung 57 A zeigt Cyclovoltammogramme eines wachsenden Biofilms auf einem Dicken-Scher-Resonator. Der Verlauf der Kurven ist vergleichbar mit den Cyclovoltammogrammen eines Biofilms auf einem Torsions-Resonator (vgl. Abbildung 56 A). Allerdings ist hier das Plateau parallel zur X-Achse, während es beim Torsions-Resonator eine leicht positive Steigung aufweist. Die Ursache hierfür könnte in den unterschiedlichen Elektrodenmaterialien begründet liegen. Beim Torsions-Resonator wachsen die Bakterien auf einem Kohlenstofflack. Dieser ist schlecht leitfähig, was zu einem Ohm'schen Beitrag im Cyclovoltammogramm führen kann. Das Elektrodenmaterial des Dicken-Scher-Resonators ist gut leitfähiges Gold. Dessen Widerstand ist so klein, dass es zu keiner nennenswerten Steigung kommt.

Abbildung 57 B und C zeigen den Effekt des Cyclovoltammogramms auf die Frequenz- und Bandbreitenverschiebung. Ohne Biofilm haben die Cyclovoltammogramme keinen Einfluss auf das Schwingverhalten des Resonators. Bei gereiften Biofilmen kommt es bei negativen



Potentialen zu einem Anstieg der Frequenzverschiebung bei einem gleichzeitigen Abfall der Bandbreitenverschiebung. Der Verlauf ist dabei deutlich strukturierter als beim Torsions-Resonator. Im Bereich von  $-310$  mV kommt es zu einem stark ausgeprägten Maximum der Bandbreitenverschiebung und einem schwächer ausgeprägten Minimum der Frequenzverschiebung. Eine genaue Interpretation dieses Verhaltens ist schwierig. Die Daten des Torsions-Resonators zeigen, dass es bei negativen Potentialen zu einer Erweichung des Biofilms kommt. Eine Erweichung zeigt sich auch in den Daten des Dicken-Scher-Resonators, auch wenn der Verlauf der Bandbreitenverschiebung gegenläufig ist. Allerdings muss hier beachtet werden, dass die Scherwelle des Dicken-Scher-Resonators eine geringe Eindringtiefe in den Biofilm hat. Wird der Biofilm weicher, dann sinkt auch die Eindringtiefe (vgl. Gleichung (14)), wodurch wiederum die Dissipation abnimmt.

### 5.7 Elektrochemische Impedanz Spektroskopie

Mithilfe der Elektrochemischen Impedanz Spektroskopie (EIS) können aus der Analyse des Wechselstromwiderstandes Informationen über das betreffende System gesammelt werden. Wichtig ist hierbei ein sinnvolles Ersatzschaltbild zu entwickeln. Aufgrund der Komplexität von elektrochemisch aktiven Biofilmen sind eine Vielzahl von Ersatzschaltbildern literaturbekannt.<sup>[101]</sup>

Alle EIS Spektren wurden bei einem konstanten Basispotential von  $-240$  mV gg. SCE aufgenommen. Der Frequenzbereich erstreckte sich über einen Bereich von  $10$  kHz bis  $10$  mHz mit je fünf Frequenzen pro Dekade. Solch kleine Frequenzen sind notwendig, weil im Biofilm langsame Prozesse ablaufen, die nur bei kleinen Frequenzen detektiert werden können. Die Amplitude des Wechselstromsignals lag bei  $10$  mV. Bei allen EIS-Messungen war auch die Schwingquarz-Mikrowaage aktiv. Vergleichsmessungen haben gezeigt, dass die Aktivität der Schwingquarz-Mikrowaage keinen Einfluss auf die Impedanzspektren hat.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

### 5.7.1 EIS an einem Biofilm auf einem Torsions-Resonator

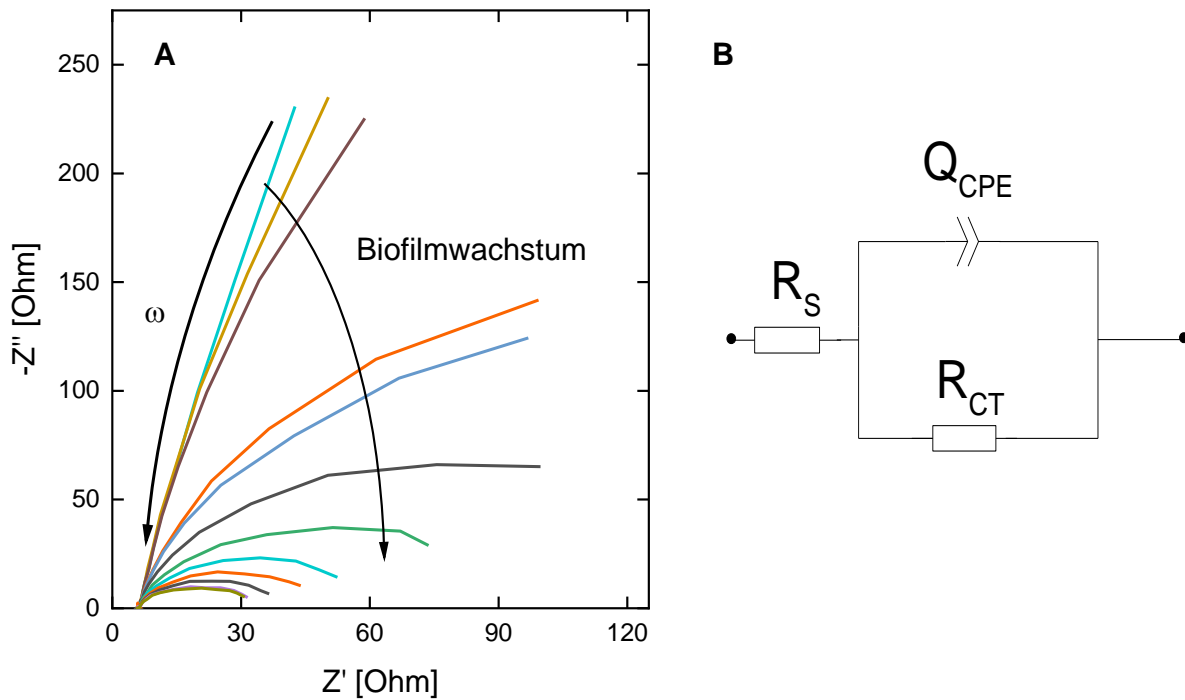


Abbildung 58: A: Nyquist-Plot ausgewählter Impedanzkurven eines Biofilms während des Anwachsens auf einem Torsions-Resonator. Die Aufnahme erfolgte in einem Frequenzbereich von 10 kHz bis 10 mHz mit einer Amplitude von 10 mV bei einem konstanten Basispotential von  $-240$  mV. B Ersatzschaltbild (nach Randles) für die Anpassung an die Daten aus A.

Abbildung 58 A zeigt mehrere Nyquist-Kurven eines auf der Elektrode anwachsenden Biofilms. Der hochfrequente Anteil ist links unten während der niederfrequente Anteil rechts bzw. oben ist. Die Struktur der Kurven ist einfach. Sie bestehen aus einer Halbellipse, die mit zunehmender Biofilmdicke kleiner wird. Ein solches Verhalten kann durch eine Randles Ersatzschaltkreis, wie er in Abbildung 58 B dargestellt ist, beschrieben werden. Dieser besteht aus dem Lösungswiderstand  $R_S$ , einem Charge-Transfer-Widerstand  $R_{CT}$  und einem Constant Phase Element  $Q_{CPE}$ . Die Gesamtimpedanz  $\tilde{Z}$  dieses Schaltkreises wird durch Gleichung (44) beschrieben.  $Q$  und  $\mu$  sind die Parameter des Constant Phase Elements:

$$\tilde{Z} = R_S + \frac{1}{Q \cdot \omega^\mu \cdot e^{i\frac{\pi}{2}\mu} + \frac{1}{R_{CT}}} \quad (44)$$

Der Lösungswiderstand  $R_S$  erfasst den Widerstand des Elektrolyten. Der Charge-Transfer Widerstand  $R_{CT}$  beschreibt den Widerstand des Ladungsübergangs von der Elektrodenoberfläche auf das Medium. Da sich das System nicht wie ein idealer Kondensator verhält, wird zur Beschreibung des kapazitiven Anteils ein Constant Phase Element benötigt.

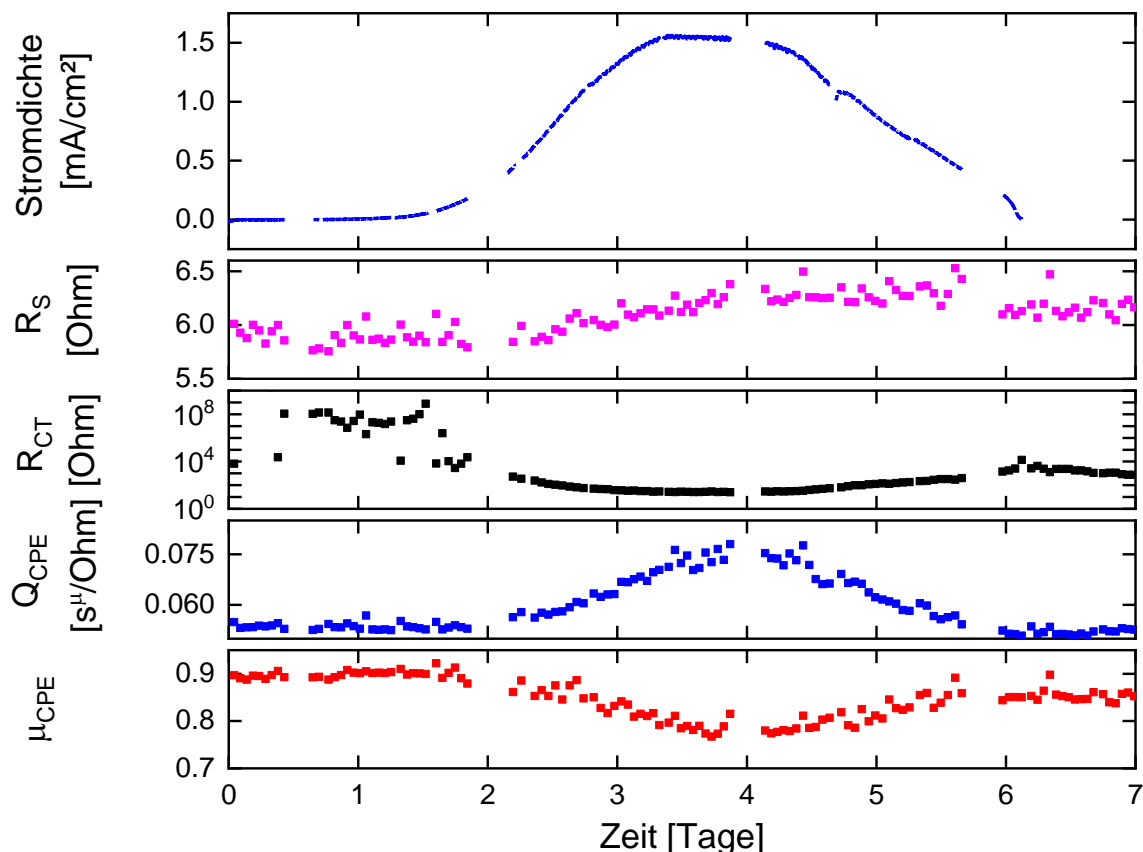
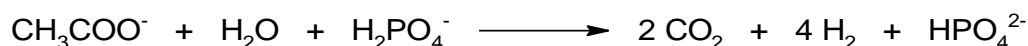


Abbildung 59: Fit Parameter nach Gleichung (44) der EIS Messung von dem Biofilm auf dem Torsions-Resonator

Abbildung 59 zeigt die Stromdichte sowie den Verlauf der Fitparameter nach Gleichung (44) für alle Daten aus Abbildung 59 A. Die Stromdichte steigt durch das Anwachsen des Biofilms an und fällt später wieder ab, weil das Acetat aufgebraucht gewesen ist.

Der Lösungswiderstand  $R_S$  liegt bei ca. 6 Ohm und nimmt etwas zu, wenn die Stromdichte ansteigt. Dies liegt am Acetatverbrauch. Die Reaktionsgleichung für die Gesamtreaktion ist:



Das geladene Acetatanion geht durch die Reaktion verloren. Daher steigt der Lösungswiderstand.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

Der Charge-Transfer Widerstand  $R_{CT}$  ist zu Beginn ohne Biofilm mit ca.  $10^9$  Ohm sehr groß. Zu dieser Zeit kann bei dem angelegten Potential keine elektrochemische Reaktion stattfinden. Die Elektrode wirkt hauptsächlich als Kondensator. Durch das Anwachsen des Biofilms und seine katalytische Wirkung wird die Acetatoxidation als Reaktionsweg erschlossen und der Charge-Transfer Widerstand sinkt bis auf 26 Ohm ab. Der Verlauf folgt dabei in guter Näherung dem Strom. Je größer der Strom ist, desto kleiner ist auch der Charge-Transfer Widerstand.<sup>[102]</sup> Wenn der Strom aufgrund der sinkenden Acetatkonzentration wieder abfällt, steigt auch der Charge-Transfer Widerstand wieder an und stabilisiert sich auf einem Niveau von ca. 1500 Ohm.

Die Pseudokapazität  $Q$  des Constant Phase Elements folgt in ihrem Verlauf ebenfalls der Stromdichte. Die Zunahme durch das Biofilmwachstum ist verständlich, weil die leitfähigen Komponenten im Biofilm fähig sind, Elektronen aufzunehmen und so als Kondensator wirken können. Dass  $Q$  nach Überschreiten des Maximums der Stromdichte wieder abfällt, kommt unerwartet. Der Biofilm und die Redoxkomponenten im Biofilm bleiben bestehen, sodass zu erwarten wäre, dass auch  $Q$  auf einem Plateau verbleibt. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Ergebnis auch nur um ein Artefakt. Der Nichtidealitätsparameter  $\mu$  fällt von einem Wert von 0.9 auf einen Wert von 0.75 ab, wenn die Stromdichte zunimmt, und steigt wieder auf 0.9 an, wenn die Stromdichte abnimmt.

## 5.7.2 EIS an einem Biofilm auf einem Dicken-Scher-Resonator

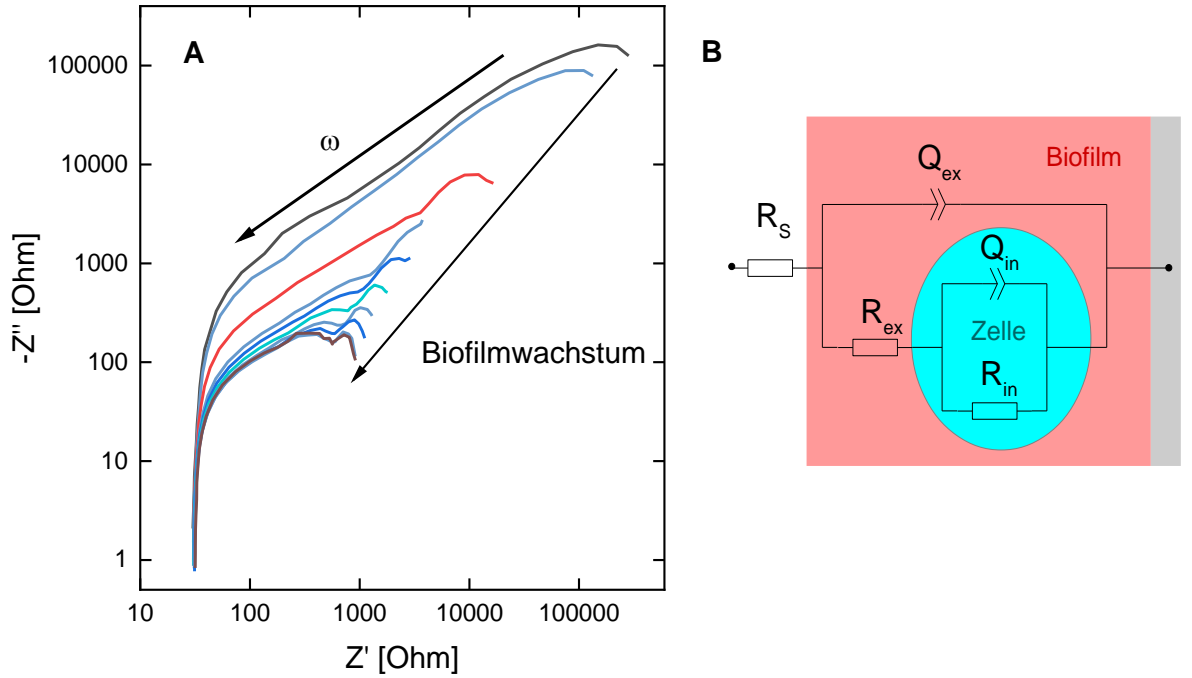


Abbildung 60: A: Nyquist-Plots von EIS Messungen an einem wachsenden Biofilm auf einem Dicken-Scherresonator. B: Ersatzschaltbild für die Anpassung.<sup>[103]</sup>

Abbildung 60 A zeigt einige Nyquist Kurven für einen Biofilm, der auf einem Dicken-Scher-Resonator anwächst. Im Vergleich zu den Nyquist Kurven auf einem Torsions-Resonator (vgl. Abbildung 58) sind diese Impedanz Kurven strukturierter. Statt einer einzelnen Halbellipse finden sich hier zwei Halbellipsen. Daher ist es nötig, wie Abbildung 60 B zeigt, dem Ersatzschaltkreis ein weiteres RQ-Element hinzuzufügen. Diese beiden Impedanzen können als eine äußere Biofilmimpedanz und eine innere Zellimpedanz interpretiert werden.<sup>[103]</sup> Die Berechnung der Gesamtimpedanz  $\tilde{Z}$  dieses Ersatzschaltkreises ist in Gleichung (45) dargestellt.

$$\tilde{Z} = R_S + \frac{1}{Q_{ex} \cdot \omega^{\mu_{ex}} \cdot e^{i\frac{\pi}{2}\mu_{ex}} + \frac{1}{\frac{1}{R_{ex}} + \frac{1}{Q_{in} \cdot \omega^{\mu_{in}} \cdot e^{i\frac{\pi}{2}\mu_{in}} + \frac{1}{R_{in}}}}} \quad (45)$$

$R_S$  ist der Lösungswiderstand,  $Q_{ex}$ ,  $\mu_{ex}$ ,  $Q_{in}$  und  $\mu_{in}$  sind die Parameter des äußeren und inneren Constant Phase Elements,  $R_{ex}$  und  $R_{in}$  ist der äußere und der innere Ohm'sche Widerstand.

## 5. Ergebnisse und Auswertung

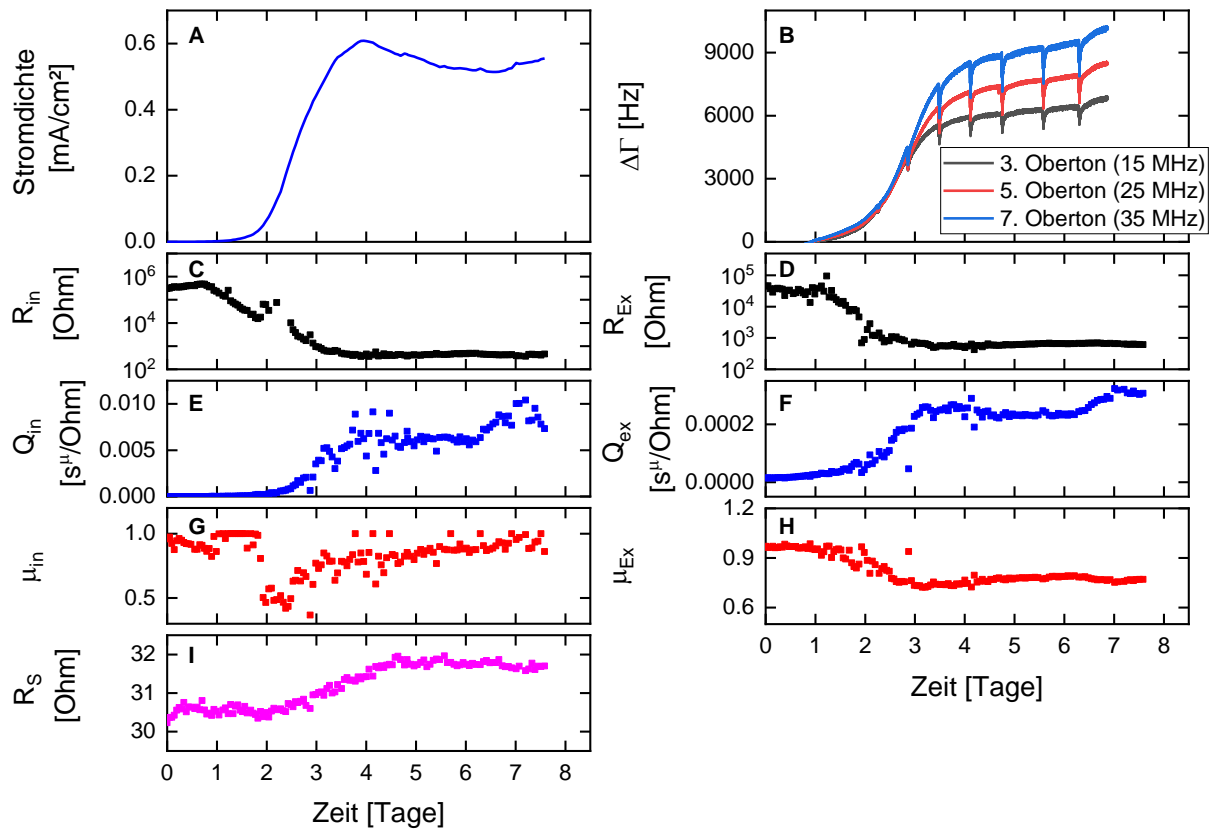


Abbildung 61: Stromdichte (A), Bandbreitenverschiebung (B) und Fit Parameter (C–I) nach Gleichung (45) eines Biofilms auf einem Dicken-Scher-Resonator

Abbildung 61 zeigt die Stromdichte (A), die Bandbreitenverschiebung (B) und die Fitparameter (C–I) nach Gleichung (45) für die Daten aus Abbildung 60 A. Die Stromdichte (A) und die Bandbreitenverschiebung (B) zeigen den für das Anwachsen eines Biofilms typischen Kurvenverlauf (vgl. Kap. 5.2.1). Ohne Biofilm sind der innere (C) und der äußere Widerstand (D) sehr groß, wobei der Äußere mit  $300 \text{ k}\Omega$  beinahe zehnmal so groß ist wie der Innere. Sobald der Biofilm anwächst, sinken beide ab und stabilisieren sich auf einem Plateauwert. Der Abfall von  $R_{ex}$  ist stärker als der Abfall von  $R_{in}$  sodass im Plateau  $R_{in}$  1.5-mal so groß ist wie  $R_{ex}$ . Dies bedeutet, dass im gereiften Biofilm der Zellmetabolismus begrenzend für die Stromdichte ist, weil dieser den größten Beitrag zum Gesamtwiderstand hat. Dieses Ergebnis steht qualitativ im Einklang mit den Ergebnissen von JUNG.<sup>[103]</sup>

Die Pseudokapazitäten  $Q$  der CPEs sind zu Beginn für die Zellen null und für den Biofilm klein. Dies ist verständlich, weil zu diesem Zeitpunkt nur die Oberfläche ohne Biofilm und Zellen vorhanden ist. Mit dem Biofilmwachstum steigen  $Q_{in}$  und  $Q_{ex}$  an, bis sie ein Plateauwert erreichen auf dem sie auch verbleiben. Der Plateauwert ist für  $Q_{in}$  um den Faktor 30 höher

als für  $Q_{\text{ex}}$ . Dies bedeutet, dass auch die Biofilmpkapazität durch die Kapazität der Zellen dominiert wird.

Der Parameter  $\mu_{\text{in}}$  ist zu Beginn bei nahezu eins, fällt dann beim Anwachsen des Biofilms auf einen Wert von etwa 0.5 ab und steigt dann wieder langsam auf einen Wert von 0.9 an. Dies zeigt, dass das CPE der Zellen am Ende einem idealen Kondensator ( $\mu = 1$ ) nahekommt. Der Parameter  $\mu_{\text{ex}}$  fällt von seinem Anfangswert bei 0.9 durch das Biofilmwachstum auf einen Wert von 0.75 ab und verbleibt auf diesem. Dies zeigt, dass das CPE des Biofilms eine deutlich größere Ähnlichkeit zu einem Ohm'schen Widerstand ( $\mu = 0$ ) hat. Darin zeigen sich, dass die Biofilmstrukturen verstärkt auf eine Stromleitung ausgelegt sind.

Der Wert des Lösungswiderstand  $R_S$  ist größer als in Abbildung 59. Der Grund dafür ist die veränderte Geometrie der Zelle. Durch den Acetatverbrauch nimmt auch hier der Widerstand mit der Zeit zu. Allerdings verbleibt er auf einem konstanten Wert, während noch Acetat verbraucht wird. Daher könnte die Änderung in  $R_S$  auch nur ein Artefakt sein.

Insgesamt zeigt ein Vergleich zwischen Abbildung 61 und Abbildung 59 nur teilweise ein kongruentes Bild. Der Unterschied im absoluten Verlauf der Kurven lässt sich durch die unterschiedlichen Messaufbauten erklären. Der Dicken-Scher-Resonator besitzt eine Goldelektrode mit guter Leitfähigkeit, während der Torsions-Resonator eine mit Graphit beschichtete Elektrode besitzt. Die Leitfähigkeit und die Eigenschaften dieser Graphitschicht unterscheiden sich signifikant von denen der Goldelektrode. Außerdem ist beim Torsions-Resonator die Arbeitselektrode mit dem Gehäuse kurzgeschlossen, sodass jede Messung auch immer das Gehäuse miterfasst. Aufgrund dieser Unterschiede kann es sein, dass auch beim Torsions-Resonator zwei Halbkreise vorhanden sind, von denen aber nur einer aufgelöst werden kann.

Der Verlauf der Biofilm-/Zellwiderstände ( $R_{\text{in}}$ ,  $R_{\text{ex}}$  und  $R_{\text{CT}}$ ) stimmt zwischen beiden Messungen überein. Diese Widerstände nehmen immer ab, wenn die Stromdichte zunimmt. In beiden Fällen erstrecken sich die Widerstände über einen großen Wertebereich von mehreren Dekaden. Dieses Ergebnis ist zuverlässig und entspricht den Erwartungen.

Die Pseudokapazitäten der CPEs nehmen jeweils zu, wenn der Biofilm anwächst. Beim Torsions-Resonator ist die Kapazität jedoch beinahe zehnmal so groß wie beim Dicken-Scher-Resonator. Dies kann daran liegen, dass, wie bereits erwähnt, die Arbeitselektrode auf dem Torsions-Resonator mit dem Halter elektrisch verbunden ist, sodass der Halter einen signifikanten Beitrag zur Gesamtkapazität leisten kann. Dazu ist die Oberfläche der Arbeitselektrode des Torsions-Resonators im Vergleich zum Dicken-Scher-Resonator um den Faktor fünf größer.

## 5. Ergebnisse und Auswertung



## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die mechanische Charakterisierung von elektrochemisch aktiven Biofilmen mittels einer Torsions- und Dickenschers-Schwingquarz-Mikrowaage. Auf beiden Arten von Resonatoren konnten elektrochemisch aktive Biofilme angezüchtet werden. Die Anzucht auf dem Dicken-Scher-Resonator erfolgte problemlos auf der Frontelektrode. Beim Torsions-Resonator war die Beschichtung des Resonators mit einer Elektrode für den Biofilm problematischer. Am Ende erwies sich ein Einbrennsilberlack, welcher vom Hersteller des Resonators aufgebracht wurde, in Kombination mit einem Graphit-Lack als ausreichend stabile Lösung. Bei Bedarf mussten jedoch beide Lacke erneuert werden. Die Haltbarkeit variierte zwischen einigen Wochen und mehreren Monaten.

Der Dicken-Scher-Resonator erlaubt hauptsächlich die Untersuchung von resonatornahen Strukturen des Biofilms. Bei den hier verwendeten Biofilmen sind dies vor allem elektrisch leitfähige Pili, die zu einer charakteristischen, Oberton-unabhängigen Bandbreitenverschiebung führen. In einer späteren Phase wird das Oberton-unabhängige Signal von einem weiteren, Oberton-abhängigen Signal überlagert. Dieses verhält sich Kanazawa-Gordon artig und kann auf die EPS zurückgeführt werden.

Mit einem Torsions-Resonator kann der Biofilm in einem weiten Dickenbereich als Ganzes untersucht werden. Aus den drei messbaren Obertönen (56 kHz, 112 kHz und 168 kHz) kann mittels eines Akustischen-Multilayer-Formalismus die Biofilmdicke, der Betrag des Schermoduls  $|\tilde{G}|$  und der Verlustfaktor des Biofilms bestimmt werden. Die Messung erfolgt in situ und online. Der Biofilm wird durch die Messung selbst nicht beeinflusst.

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten in Korrelation mit der elektrischen Leistung des Biofilms untersucht (Kap. 5.2 - 5.4). In der Anfangsphase, bis ca. 50 % der maximalen Stromdichte erreicht worden sind, sind Biofilmdicke und Stromdichte zueinander proportional. In diesem Bereich kann noch jede neu gebildete Zelle mit ihrer vollen elektrischen Leistungsfähigkeit zur gesamten elektrischen Leistung des Biofilms beitragen. Das Wachstum erfolgt näherungsweise exponentiell. Die Stromeffizienz liegt in diesem Bereich bei  $(400 \pm 100) \mu\text{A}/\text{mm}^3$ . Ab einer Biofilmdicke von  $(36 \pm 3) \mu\text{m}$  bleibt die Stromdichte konstant bzw. nimmt ab. Dies ist die ideale Dicke für den Betrieb des Biofilms in einer MFC mit Acetat als Kohlenstoffquelle. Weil diese ideale Biofilmdicke sowohl von der Temperatur als auch von der Acetatkonzentration unabhängig ist, ist wahrscheinlich der Elektronentransport zur Elektrode für diese Begrenzung verantwortlich. Die Leitfähigkeit der Pili kann allerdings auch über

## 6. Zusammenfassung

den pH-Wert durch den Protonen Transport beeinflusst werden. Mit dem Dicken-Scher-Resonator konnte beobachtet werden, dass der Oberton-unabhängige Anteil der Bandbreitenverschiebung der Stromdichte folgt und nach Erreichen der maximalen Stromdichte ebenfalls konstant bleibt. Dies bedeutet, dass es zu keiner weiteren Ausbildung von Pili kommt, die die Resonatoroberfläche erreichen.

Das Wachstum des Biofilms erfolgt nach einer kurzen exponentiellen Phase über lange Zeiten linear zur Zeit. In diesem Bereich liegt die Wachstumsgeschwindigkeit typischerweise in einem Bereich zwischen 10  $\mu\text{m}/\text{Tag}$  und 25  $\mu\text{m}/\text{Tag}$ . Der genaue Wert hängt von der Temperatur und dem angelegten Potential ab. Höhere Temperaturen bzw. positivere Potentiale erhöhen die Wachstumsgeschwindigkeit. Die Biofilmdicke ist während der gesamten Wachstumszeit in guter Näherung proportional zur geflossenen Ladungsmenge. Das heißt, dass der Biofilmaufbau, trotz seiner komplexen Natur, Faraday'sch erfolgt. Aus einem Coulomb werden  $(25 \pm 5) \mu\text{g}$  Biofilm aufgebaut. Mit einem Feststoffgehalt von 10 % ergibt sich eine Effizienz für den Biofilmaufbau in Bezug auf das Acetat von 3 %.

Nach der Untersuchung des Biofilmwachstums wurde das Verhalten des Biofilms auf äußeren Stress untersucht (Kap. 5.5 – 5.6). Auf diesem Weg können elektrochemisch aktive Biofilme Anwendung im „Whole-cell-based biosensing“ finden. Als erstes wurde der Effekt von Acetatmangel auf den Biofilm untersucht, indem Acetat während des Anwachsens immer nur in kleinen Portionen hinzugegeben wurde, sodass sich Acetat-arme Zeiten mit Acetat-reichen Zeiten abwechseln. Die Stromdichte reagierte immer innerhalb von wenigen Minuten auf die Acetatzugabe. Die mechanische Reaktion des Biofilms war langsamer und erfolgte im Zeitraum einer halben Stunde. Es zeigte sich, dass es eine Grenz-Acetat-Konzentration gab, bei der sich das Wachstumsverhalten des Biofilmes ändert. Oberhalb dieser Konzentration wächst der Biofilm, unterhalb stagniert das Wachstum bzw. dünne Biofilme können sogar schrumpfen. Die Grenzkonzentration ist von der Biofilmdicke abhängig. Je dicker der Biofilm ist, desto kleiner wird die Grenzkonzentration. Bei einer Biofilmdicke von 35  $\mu\text{m}$  ändert sich das Verhalten des Biofilms grundsätzlich. Ab dieser Biofilmdicke stagniert das Biofilmwachstum nicht mehr in acetatarmen Zeiten. Stattdessen nimmt die Biofilmdicke deutlich zu. Weil kein Acetat für den Biofilmaufbau vorhanden war, muss diese Zunahme in Veränderungen an der EPS Struktur begründet liegen.

Der zweite wichtige Parameter ist Steifigkeit. Bei gereiften Biofilmen nimmt die Steifigkeit unter Acetatmangelbedingungen ab. In der Anfangsphase des Biofilmwachstums wird die acetatbedingte Erweichung von der wachstumsbedingten Versteifung überlagert. Erst bei sehr kleinen Acetatkonzentrationen zeigt sich auch hier eine Erweichung.

Anstatt Acetat verarmen zu lassen, kann auch das Potential der Elektrode modifiziert werden, sodass das Oxidationspotential ungünstiger für *Geobacter sulfurreducens* wird. In diesem Fall kommt es zu einem „Ersticken“ des Biofilms. Auch hier zeigte sich wieder, dass die Stromdichte als erstes auf ein verändertes Potential reagiert. Die mechanischen Eigenschaften des Biofilms reagierten langsamer. Wie beim Acetatmangel kam es zu einer Erweichung des Biofilms bei Potentialen bei denen der Biofilm leidet. Die Erweichung kann auch beim Durchlaufen eines Cyclovoltammogramms (mit 1 mV/s) beobachtet werden (Kap. 5.6). Allerdings ist hier der Effekt weniger stark ausgeprägt, weil die Änderung des Potentials schnell geschieht und so die Zeit für größere Änderungen im Biofilm zu kurz ist.

In Bezug auf die Biofilmdicke ist das Verhalten im Vergleich zum Acetatmangel unterschiedlich. Während das Biofilmwachstum bei Acetatmangel im Wesentlichen stagniert, kommt es bei gereiften Biofilmen bei ungünstigen Potentialen zu Auflösungseffekten.

Die Schwingquarz-Mikrowaage konnte mit der Elektrochemischen Impedanzspektroskopie gekoppelt werden (Kap. 5.7). Die EIS erfasst die elektrischen Eigenschaften des Biofilms. Es zeigte sich, dass die Form der Nyquist-Plots vom verwendeten Resonatortyp abhängt. Während beim Torsions-Resonator nur eine Halbellipse erkennbar war, bilden sich beim Dicken-Scher-Resonator zwei Halbellipsen aus. Als verlässlicher Parameter hat sich der Charge-Transfer Widerstand erwiesen. Er verhält sich, wie erwartet, antiproportional zur Stromdichte. Die Interpretation der anderen Parameter war schwieriger. Eine eindeutige Korrelation mit den Parametern der Schwingquarz-Mikrowaage konnte nicht beobachtet werden.

## 6. Zusammenfassung

## 7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erfolgreich Biofilme von *Geobacter sulfurreducens* mit der Schwingquarz-Mikrowaage untersucht werden. Ein Problem stellt immer noch die Haltbarkeit der Arbeitselektrode auf dem Torsions-Resonator dar. Die Haltbarkeit konnte zwar im Rahmen dieser Arbeit ausreichend optimiert werden, sodass auch mehrwöchige Experimente möglich waren. Aber nach einiger Zeit veränderte sich die Elektrode und löste sich ab. Eine Beschichtung zu finden, die dauerhaft hält, würde die Arbeit erleichtern und die Reproduzierbarkeit der Versuche erhöhen.

Das Feld der elektrochemisch aktiven Biofilme ist damit noch nicht erschöpft. Einerseits können mit *Geobacter sulfurreducens* weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wie z.B. die Verwendung von Reinkulturen, um *Geobacter* spezifische Ergebnisse zu validieren. Alternativ könnten aber auch *Geobacter sulfurreducens* Biofilme in einem anwendungsnahen Umfeld untersucht werden, z.B. mit echtem Abwasser als Substrat in einer Flusszelle.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit der Schwingquarz-Mikrowaage Änderungen im Biofilm gemessen werden können, die durch die Änderung äußerer Parameter entstanden sind. Dies bietet die Möglichkeit, diese Messtechnik im Rahmen eine „Whole-cell-based Biosensor“ als Sensor zu verwenden.

Andererseits können auch weitere biofilmbildende elektrochemisch aktive Biofilme alternativer Bakterienarten untersucht werden (z.B. *Shewanella oneidensis*).<sup>[104]</sup> Deren Biofilme unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrem Leitfähigkeits-Mechanismus von *Geobacter* Biofilmen.

Neben den elektrochemisch aktiven Biofilmen können auch „normale“ Biofilme mit der Schwingquarz-Mikrowaage untersucht werden. Da Biofilme auch in vielen technischen Anlagen vorkommen und zu Problemen führen können, kann mit der Schwingquarz-Mikrowaage die Entwicklung und ggf. der Bekämpfungserfolg beobachtet werden.

## 7. Ausblick

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Biologie in unserer Zeit*, **2001**, 31, 169–180.
- [2] V. Kiran, B. Gaur, *Reviews in Chemical Engineering*, **2013**, 29.
- [3] A. M. Speers, G. Reguera, *Applied and environmental microbiology*, **2012**, 78, 437–444.
- [4] A. Heydorn, A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersbøll, S. Molin, *Microbiology (Reading, England)*, **2000**, 146 ( Pt 10), 2395–2407.
- [5] A. L. J. Olsson, M. R. Mitzel, N. Tufenkji, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **2015**, 136, 928–934.
- [6] V. Reipa, J. Almeida, K. D. Cole, *Journal of microbiological methods*, **2006**, 66, 449–459.
- [7] W. Bucking, B. Du, A. Turshatov, A. M. Konig, I. Reviakine, B. Bode, D. Johannsmann, *The Review of scientific instruments*, **2007**, 78, 74903.
- [8] N. Noffke, D. Christian, D. Wacey, R. M. Hazen, *Astrobiology*, **2013**, 13, 1103–1124.
- [9] J. R. Porter, *Bacteriological Reviews*, **1976**, 40, 260–269.
- [10] M. G. Mazza, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2016**, 49, 203001.
- [11] T. F. Mah, G. A. O'Toole, *Trends in Microbiology*, **2001**, 9, 34–39.
- [12] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, *Science (New York, N.Y.)*, **1999**, 284, 1318–1322.
- [13] O. J. Hao, J. M. Chen, L. Huang, R. L. Buglass, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **1996**, 26, 155–187.
- [14] G. Muyzer, A. J. M. Stams, *Nature reviews. Microbiology*, **2008**, 6, 441–454.
- [15] L. Diels, N. van der Lelie, L. Bastiaens, *Rev Environ Sci Biotechnol*, **2002**, 1, 75–82.
- [16] C. Nicolella, M. C. M. van Loosdrecht, J. J. Heijnen, *Journal of Biotechnology*, **2000**, 80, 1–33.
- [17] M. C. Potter, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **1911**, 84, 260–276.
- [18] K. Rabaey, W. Verstraete, *Trends in biotechnology*, **2005**, 23, 291–298.
- [19] M. Rahimnejad, A. Adhami, S. Darvari, A. Zirepour, S.-E. Oh, *Alexandria Engineering Journal*, **2015**, 54, 745–756.

## 8. Literaturverzeichnis

- [20] D. C. Holzman, *Environmental health perspectives*, **2005**, 113, A754-7.
- [21] K. P. Nevin, T. L. Woodard, A. E. Franks, Z. M. Summers, D. R. Lovley, *mBio*, **2010**, 1.
- [22] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Chemie in unserer Zeit*, **2002**, 36, 30–42.
- [23] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Nature reviews. Microbiology*, **2010**, 8, 623–633.
- [24] J. R. Lawrence, G. D. W. Swerhone, G. G. Leppard, T. Araki, X. Zhang, M. M. West, A. P. Hitchcock, *Applied and environmental microbiology*, **2003**, 69, 5543–5554.
- [25] G. M. Teitzel, M. R. Parsek, *Applied and environmental microbiology*, **2003**, 69, 2313–2320.
- [26] N. Billings, M. Millan, M. Caldara, R. Rusconi, Y. Tarasova, R. Stocker, K. Ribbeck, *PLoS pathogens*, **2013**, 9, e1003526.
- [27] K. M. Colvin, V. D. Gordon, K. Murakami, B. R. Borlee, D. J. Wozniak, G. C. L. Wong, M. R. Parsek, *PLoS pathogens*, **2011**, 7, e1001264.
- [28] J. G. Elkins, D. J. Hassett, P. S. Stewart, H. P. Schweizer, T. R. McDermott, *Applied and environmental microbiology*, **1999**, 65, 4594–4600.
- [29] S. H. Barondes, *Science (New York, N.Y.)*, **1984**, 223, 1259–1264.
- [30] F. Ahimou, P. Jacques, M. Deleu, *Enzyme and Microbial Technology*, **2000**, 27, 749–754.
- [31] L. R. Rodrigues, I. M. Banat, H. C. van der Mei, J. A. Teixeira, R. Oliveira, *Journal of applied microbiology*, **2006**, 100, 470–480.
- [32] R. E. Steinberger, P. A. Holden, *Applied and environmental microbiology*, **2005**, 71, 5404–5410.
- [33] D. Monroe, *PLoS Biology*, **2007**, 5.
- [34] W. M. Dunne, *Clinical microbiology reviews*, **2002**, 15, 155–166.
- [35] B. H. Kim, H. J. Kim, M. S. Hyun, D. H. Park, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **1999**, 9, 127–131.
- [36] D. R. Bond, D. R. Lovley, *Applied and environmental microbiology*, **2003**, 69, 1548–1555.
- [37] Z. Du, H. Li, T. Gu, *Biotechnology advances*, **2007**, 25, 464–482.



- [38] U. Schroder, *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, **2007**, 9, 2619–2629.
- [39] N. L. Ing, T. D. NUSCA, A. I. Hochbaum, *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, **2017**, 19, 21791–21799.
- [40] S. K. Sure, L. M. Ackland, A. A. Torriero, A. Adholeya, M. Kochar, *Microbiology (Reading, England)*, **2016**.
- [41] N. S. Malvankar, M. Vargas, K. P. Nevin, A. E. Franks, C. Leang, B.-C. Kim, K. Inoue, T. Mester, S. F. Covalla, J. P. Johnson et al., *Nature nanotechnology*, **2011**, 6, 573–579.
- [42] S. T. Oh, J. R. Kim, G. C. Premier, T. H. Lee, C. Kim, W. T. Sloan, *Biotechnology advances*, **2010**, 28, 871–881.
- [43] D. R. Bond, S. M. Strycharz-Glaven, L. M. Tender, C. I. Torres, *ChemSusChem*, **2012**, 5, 1099–1105.
- [44] J. T. Babauta, H. D. Nguyen, T. D. Harrington, R. Renslow, H. Beyenal, *Biotechnology and bioengineering*, **2012**, 109, 2651–2662.
- [45] D. R. Lovley, J. F. Stolz, G. L. Nord, E. J. P. Phillips, *Nature*, **1987**, 330, 252–254.
- [46] G. Reguera, K. P. Nevin, J. S. Nicoll, S. F. Covalla, T. L. Woodard, D. R. Lovley, *Applied and environmental microbiology*, **2006**, 72, 7345–7348.
- [47] M. Stöckl, N. C. Teubner, D. Holtmann, K.-M. Mangold, W. Sand, *ACS applied materials & interfaces*, **2019**, 11, 8961–8968.
- [48] C. Engel, F. Schattenberg, K. Dohnt, U. Schröder, S. Müller, R. Krull, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **2019**, 7, 60.
- [49] F. Caccavo, D. J. Lonergan, D. R. Lovley, M. Davis, J. F. Stolz, M. J. McInerney, *Applied and environmental microbiology*, **1994**, 60, 3752–3759.
- [50] R. Moscoviz, F. de Fouchécour, G. Santa-Catalina, N. Bernet, E. Trably, *Scientific reports*, **2017**, 7, 44334.
- [51] R. K. Thauer, D. Möller-Zinkhan, A. M. Spormann, *Annual review of microbiology*, **1989**, 43, 43–67.
- [52] Y. J. Tang, R. Chakraborty, H. G. Martín, J. Chu, T. C. Hazen, J. D. Keasling, *Applied and environmental microbiology*, **2007**, 73, 3859–3864.

## 8. Literaturverzeichnis

- [53] R. Mahadevan, D. R. Bond, J. E. Butler, A. Esteve-Nuñez, M. V. Coppi, B. O. Pals-son, C. H. Schilling, D. R. Lovley, *Applied and environmental microbiology*, **2006**, 72, 1558–1568.
- [54] J. Xiao, J. M. VanBriesen, *Biotechnology and bioengineering*, **2006**, 93, 110–121.
- [55] A. Krige, M. Sjöblom, K. Ramser, P. Christakopoulos, U. Rova, *Molecules (Basel, Switzerland)*, **2019**, 24.
- [56] T. C. Santos, M. A. Silva, L. Morgado, J. M. Dantas, C. A. Salgueiro, *Dalton transac-tions (Cambridge, England : 2003)*, **2015**, 44, 9335–9344.
- [57] M. R. Shoar Abouzari, F. Berkemeier, G. Schmitz, D. Wilmer, *Solid State Ionics*, **2009**, 180, 922–927.
- [58] B. Neubig, W. Briese, *Das große Quarzkochbuch. Quarze, Quarzoszillatoren, Quarz-und Oberflächenwellenfilter (SAW), Meßtechnik ; mit 23 Tabellen*, Franzis, Feldkirchen, **1997**.
- [59] G. Sauerbrey, *Z. Physik*, **1959**, 155, 206–222.
- [60] R. E. Speight, M. A. Cooper, *Journal of molecular recognition : JMR*, **2012**, 25, 451–473.
- [61] D. Johannsmann, *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, **2008**, 10, 4516–4534.
- [62] Johannsmann, Mathauer, Wegner, Knoll, *Physical review. B, Condensed matter*, **1992**, 46, 7808–7815.
- [63] K. Keiji Kanazawa, J. G. Gordon, *Analytica Chimica Acta*, **1985**, 175, 99–105.
- [64] W. P. Mason, *Piezoelectric crystals and their application to ultrasonics*, Van Nos-trand, New York, **1950**.
- [65] A. P. M. Glassford, *Journal of Vacuum Science and Technology*, **1978**, 15, 1836–1843.
- [66] A. A. Tabidze, R. K. Kazakov, *Meas Tech*, **1983**, 26, 24–27.
- [67] A. P. Borovikov, *Instruments and Experimental Techniques*, **1976**, 223–224.
- [68] D. Johannsmann, *Macromol. Chem. Phys.*, **1999**, 200, 501–516.
- [69] A. Domack, O. Prucker, J. Rühe, D. Johannsmann, *Phys. Rev. E*, **1997**, 56, 680–689.

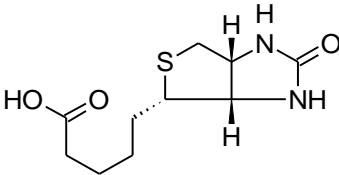

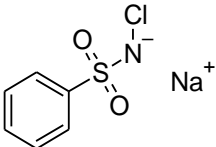
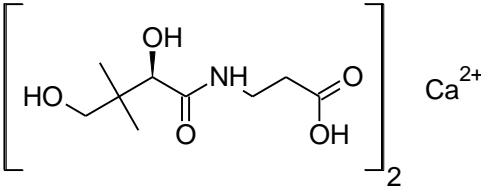
- [70] D. Johannsmann in *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors* (Eds.: C. Steinem, A. Janshoff), Springer Berlin Heidelberg, **2007**.
- [71] P. Sievers, C. Moß, U. Schröder, D. Johannsmann, *Biosensors and Bioelectronics*, **2018**, *110*, 225–232.
- [72] Z. A. Shana, H. Zong, F. Josse, D. C. Jeutter, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1994**, *379*, 21–33.
- [73] D. Johannsmann, *The Quartz Crystal Microbalance in Soft Matter Research*, Springer International Publishing, Cham, **2015**.
- [74] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, 2. ed. ed., Wiley, Hoboken, NJ, **2001**.
- [75] "QTM", unter: <https://www.pc.tu-clausthal.de/forschung/qcm-modellierung/>, **2019**.
- [76] B. Jiang, T. Muddemann, U. Kunz, H. Bormann, M. Niedermeiser, D. Haupt, O. Schläfer, M. Sievers, *J. Electrochem. Soc.*, **2016**, *164*, H3083-H3090.
- [77] W. E. Balch, G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, R. S. Wolfe, *Microbiological Reviews*, **1979**, *43*, 260–296.
- [78] Philipp Sievers, Masterarbeit, Technische Universität Clausthal, Clausthal-Zellerfeld, **2016**.
- [79] A. F. Collings, E. McLaughlin, *Trans. Faraday Soc.*, **1971**, *67*, 340.
- [80] B. Bode, Dissertation, Technische Universität Clausthal, Clausthal-Zellerfeld, **1984**.
- [81] J.-P. Bonnet, L. Devesvre, J. Artaud, P. Moulin, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2011**, *113*, 1019–1025.
- [82] M. Pecovska-Gjorgjevich, A. Andonovski, J. Velevska, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **2012**, 285–294.
- [83] J. Wu, A. H. Nhaesi, A.-F. A. Asfour, *J. Chem. Eng. Data*, **1999**, *44*, 990–993.
- [84] D. R. Lide, *CRC handbook of chemistry and physics. A ready-reference book of chemical and physical data*, 83. ed., 2002 - 2003 ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., **2002**.
- [85] J. T. Babauta, C. A. Beasley, H. Beyenal, *CHEMELECTROCHEM*, **2014**, *1*, 2007–2016.
- [86] J. M. Kleijn, Q. Lhuillier, A. W. Jeremiasse, *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, **2010**, *79*, 272–275.

## 8. Literaturverzeichnis

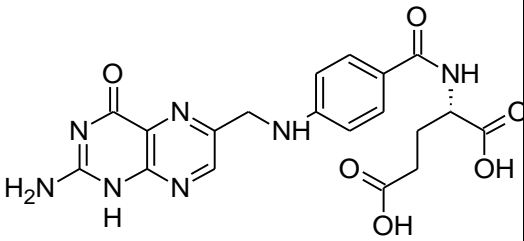
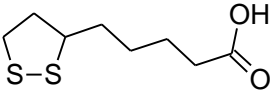
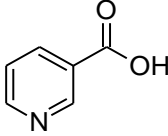
- [87] Y. Liu, A. Berná, V. Climent, J. M. Feliu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**, 209, 781–789.
- [88] K. Liu, Vertiefungsbericht, TU Clausthal, Clausthal-Zellerfeld, **2019**.
- [89] G. Reguera, K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, D. R. Lovley, *Nature*, **2005**, 435, 1098–1101.
- [90] K. Liu, Bachelorarbeit, TU Clausthal, Clausthal-Zellerfeld, **2019**.
- [91] V. D. Gordon, M. Davis-Fields, K. Kovach, C. A. Rodesney, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2017**, 50, 223002.
- [92] D. Sun, J. Chen, H. Huang, W. Liu, Y. Ye, S. Cheng, *International Journal of Hydrogen Energy*, **2016**, 41, 16523–16528.
- [93] R. Y. Adhikari, N. S. Malvankar, M. T. Tuominen, D. R. Lovley, *RSC Adv.*, **2016**, 6, 8354–8357.
- [94] J. Schmitt, H. -C. Flemming, *Water Science and Technology*, **1999**, 39, 77–82.
- [95] A. M. Speers, J. M. Young, G. Reguera, *Environmental science & technology*, **2014**, 48, 6350–6358.
- [96] J. Bosch, K.-Y. Lee, S.-F. Hong, F. Harnisch, U. Schroder, R. U. Meckenstock, *Current microbiology*, **2014**, 68, 763–768.
- [97] K. Trincher, *Z. Naturforsch.*, **1979**, 474–477.
- [98] R. K. Thauer, K. Jungermann, K. Decker, *Bacteriological Reviews*, **1977**, 41, 100–180.
- [99] G. M. BROWN, *The Journal of biological chemistry*, **1962**, 237, 536–540.
- [100] S. Patil, F. Harnisch, U. Schröder, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, **2010**, 11, 2834–2837.
- [101] X. Dominguez-Benetton, S. Sevda, K. Vanbroekhoven, D. Pant, *Chemical Society reviews*, **2012**, 41, 7228–7246.
- [102] Ramaraja P Ramasamy, Narendran Sekar, *J Microbial Biochem Technol*, **2013**.
- [103] Sokhee Jung, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2012**, 11091–11100.
- [104] Y. Cao, H. Mu, W. Liu, R. Zhang, J. Guo, M. Xian, H. Liu, *Microbial cell factories*, **2019**, 18, 39.

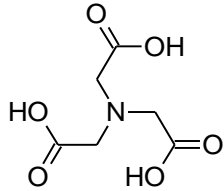
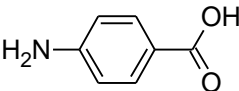
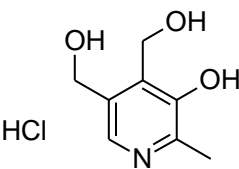
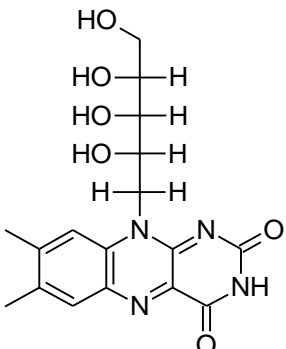
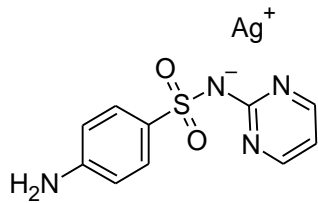
## 9 Anhang

### 9.1 Liste der verwendeten Chemikalien

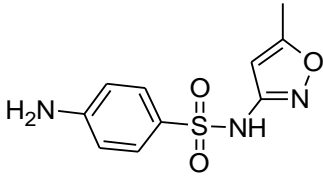
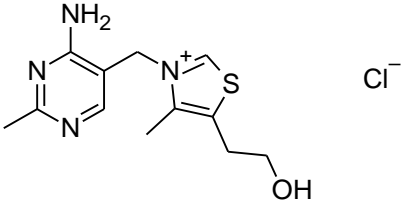
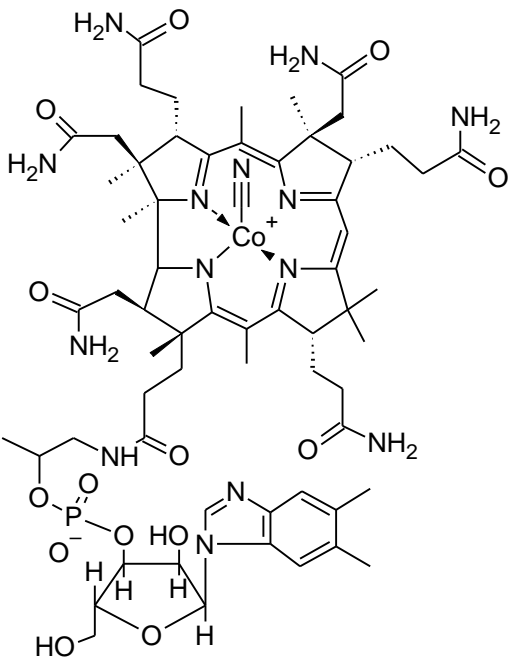
Name	CAS-Nummer	Struktur	Reinheit, Hersteller
Ammoniumchlorid	12125-02-9	$\text{NH}_4\text{Cl}$	99.5 %, Sigma-Aldrich
Biotin (Vitamin B <sub>7</sub> )	58-85-5		98 %, TCI
Borsäure	10043-35-3	$\text{H}_3\text{BO}_3$	99 %, Merck
Butanon	78-93-3		99 %, Merck
Calciumchlorid	10043-52-4	$\text{CaCl}_2$	99 %, Sigma-Aldrich
Chloramin B	127-52-6		>80.0 %, TCI
Cobaltchlorid-Hexahydrat	7791-13-1	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	purum p.a. 99 %, Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat	7558-80-7	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	for cell culture, Sigma-Aldrich
DL-Calciumpantothenat (Vitamin B <sub>5</sub> )	137-08-6		99 %, Sigma-Aldrich

## 9. Anhang

Eisensulfat-Heptahydrat	7782-63-0	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	99 %, Merck
Folsäure (Vitamin B <sub>9</sub> )	59-30-3		Cell Culture Reagent, Alfa Aesar
Kaliumaluminiumsulfat	10043-67-1	$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	98 %, Alfa Aesar
Kaliumchlorid	7447-40-7	KCl	99 %, Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	1310-58-3	KOH	p.a., 85 %
Kupfersulfat-Pentahydrat	7758-99-8	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	chem. Pure, Riedel-De Haen AG
Liponsäure	1077-28-7		99 %, Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	10034-99-8	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	purum p.a. 99 %, Fluka
Mangansulfat-Monohydrat	10034-96-5	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	for cell culture, Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	7647-14-5	NaCl	99 %
Natriumdihydrogenphosphat	10049-21-5	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	pro analysi, Merck
Nikotinsäure	59-67-6		99 %, TCI

Nitrilotriessigsäure	139-13-9		99 %, Alfa Aesar
<i>p</i> -Aminobenzoessäure	150-13-0		99 %, TCI
Pyridoxinhydrochlorid (Vitamin B <sub>6</sub> )	58-56-0		99 %, Alfa Aesar
Quecksilber(II)-chlorid	7487-94-7	HgCl <sub>2</sub>	pro analysi, Merck
Riboflavin (Vitamin B <sub>2</sub> )	83-88-5		98 %, from Eremothecium ashbyii, Sigma-Aldrich
Sulfadiazin	22199-08-2		>99.0 %, TCI

## 9. Anhang

Sulfamethoxazol	723-46-6		>98.0 %, TCI
Thiaminhydrochlorid (Vitamin B <sub>1</sub> )	67-03-8		99 %, Sigma-Aldrich
Cyanocobalamin (Vitamin B <sub>12</sub> )	68-19-9		98 %, Sigma-Aldrich
Zinksulfat-Heptahydrat	7446-20-0	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	pro analysi, Merck



## 9.2 Liste der verwendeten Symbole und Konstanten

Symbol	Bedeutung
$A$	Aktive Fläche
$a_i$	Aktivität der Komponente $i$
$B$	Suszeptanz
$C$	Kapazität
$C_0$	Parallele Kapazität
$C_1$	Mechanische Kapazität
$c_O$	Konzentration des Oxidationsmittels
$c_R$	Konzentration des Reduktionsmittels
$d$	Dicke
$D_{\text{eff}}$	Effektiver Diffusionskoeffizient
$d_f$	Filmdicke
$d_{\text{Nernst}}$	Dicke der Nernstschiicht
$E$	Elektrisches Potential
$E^0$	Standardpotential
$f$	Frequenz
$F$	Faraday-Konstante (96485.332 C/mol)
$f_0$	Fundamentalfrequenz
$f_{\text{Res}}$	Resonanzfrequenz
$f_{\text{Ref}}$	Referenzfrequenz
$G$	Konduktanz
$G'$	Realteil des Schermoduls
$G''$	Imaginärteil des Schermoduls
$\tilde{G}$	Komplexer Schermodul

## 9. Anhang

$H$	Faraday-Effizienz
$I$	Elektrischer Strom
$i$	Imaginäre Einheit
$I_0$	Amplitude d. elektrischen Stroms
$J$	Piloeffizienz
$j$	Stromdichte
$j_0$	Austauschstromdichte
$\tilde{k}_f$	Komplexer Wellenvektor
$k_t$	Piezoelektrischer Kopplungskoeffizient
$L_Z$	Länge des Zylinders
$L$	geometrischer Faktor
$L_1$	Mechanische Induktivität
$M$	Masse
$M_Q$	Masse des Schwingquarzes
$n$	Obertonordnung
$P$	Stromeffizienz
$Q$	Ladungsmenge
$Q_0$	Pseudokapazität des CPE
$R$	Allgemeine Gaskonstante
$R_1$	Mechanischer Widerstand
$R_{CT}$	Charge-Transfer Widerstand
$R_s$	Ohm'scher Widerstand des Lösungsmittels
$R_Z$	Radius des Zylinders
$t$	Zeit
$T$	Temperatur
$U$	Elektrische Spannung

$U_0$	Amplitude der elektrischen Spannung
$u_F$	Auslenkung an Zylinderfront
$\hat{u}_f$	Auslenkung der Scherwelle im Film
$\hat{u}_b$	Auslenkung der Scherwelle im Bulk
$u_M$	Auslenkung am Zylindermantel
$u_{\max}$	Auslenkungsamplitude
$\hat{v}_S$	Schergeschwindigkeit
$\tilde{Y}$	Admittanz
$\tilde{Z}$	Impedanz
$z$	Position entlang der z-Achse
$z_e$	Anzahl ausgetauschter Ladungen
$\tilde{Z}_{\text{CPE}}$	El. Impedanz des Constant Phase Elements
$\tilde{Z}_L$	Komplexe Lastimpedanz
$Z_Q$	Akustische Impedanz von Quarz
$\alpha$	Ladungstransferkoeffizient
$\beta'$	Exponent des Realteils
$\beta''$	Exponent des Imaginärteils
$\Gamma$	Bandbreite
$\Gamma_{\text{Ref}}$	Referenzbandbreite
$\delta$	Eindringtiefe der Scherwelle
$\Delta f$	Frequenzverschiebung
$\Delta \tilde{f}$	Komplexe Frequenzverschiebung
$\Delta \Gamma$	Bandbreitenverschiebung
$\Delta \Gamma_n$	Oberton-abhängiger Anteil von $\Delta \Gamma$
$\Delta \Gamma_0$	Oberton-unabhängiger Anteil von $\Delta \Gamma$
$\varepsilon$	Relative Permittivität

## 9. Anhang

$\epsilon_0$	Permittivität
$\eta$	Viskosität
$\kappa$	Leitfähigkeit
$\mu$	Nichtidealitätsparameter des CPE
$\nu_i$	Stöchiometrischer Koeffizient der Komponente i
$\xi$	Dämpfungskonstante
$\rho$	Dichte
$\rho_{\text{Liq}}$	Dichte der Flüssigkeit
$\langle \hat{\sigma}_S \rangle_{\text{area}}$	Flächengemittelte Scherspannung
$\varphi$	Phasenverschiebung
$\omega$	Kreisfrequenz

### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ATP	Adenosintriphosphat
BES	Bioelektrische Systeme
CPE	Constant Phase Element
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DET	Direkte Elektronen Transfer
EAB	Elektrochemisch Aktiver Biofilm
EIS	Elektrochemische Impedanz Spektroskopie
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
MEC	Mikrobielle Elektrolysezelle
MFC	Mikrobielle Brennstoffzellen
MSC	Mikrobielle Synthesezelle
NAD <sup>+</sup> ,NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
QCM	Quartz Crystal Microbalance
SCE	Gesättigte Kalomelelektrode
SHE	Standardwasserstoffelektrode

## 9.4 Übersicht über alle Messungen

Nr.	Anmerkung	Temperatur [°C]	Max.Strom- dichte [mA/cm <sup>2</sup> ]	d(j <sub>max</sub> ) [μm]	G  <sub>max</sub> [kPa]	Faraday- Effizienz [μg/C]	Strom- Effizienz [μA/mm <sup>3</sup> ]	Wachstums- geschw. [μm/Day]	
10	Std. Ansatz	35.0	1.19	32		16	473	20	Kap. 5.4.2–5.4.4
14	Std. Ansatz	35.0	1.44	37		21	810	24	Kap. 5.4.2–5.4.4
15	Std. Ansatz	35.0	1.56	37	614	22	554	27	Kap. 5.4.2–5.4.4, Abb. 59
20	Std. Ansatz	28.0	1.24	40	680	25		16	Kap. 5.4.2–5.4.4
21	Std. Ansatz	26.0	0.92	34	619	24	48	20	Kap. 5.4.2–5.4.4
32	Std. Ansatz	23.0	0.63	38	308	20	50	10	Kap. 5.4.2–5.4.4
33	Nur Acetat	23.3	0.61	39	227	32	34	16	Abb. 34, Abb. 56
41	Std. Ansatz	29.0	0.42	23	480	36	41	25	Kap. 5.4.2–5.4.4
43	Std. Ansatz	24.1	0.72	38	324	23	24	9	Kap. 5.4.2–5.4.4
47	Std. Ansatz	22.7	0.47	34	211	27	43	11	Abb. 28
30	Konz. Abh.	20.3	0.53	32	291	18	22	11	Abb. 38
31	Konz. Abh.	23.2				26	52	10	
36	Konz. Abh.	27.3	0.75		452	29	50	20	
37	Acetat Ver- armung	26.8			202	25		2	Abb. 44
38	Acetat Ver- armung	28.6			152	17		1	
24	Glycerin	21.6	0.67	27	1044	20	51	9	Abb. 31 A, Kap. 5.4.2–5.4.4
25	Glycerin	21.4	0.33	14	545	21	31	6	Abb. 31 B, Kap. 5.4.2–5.4.4
26	Glycerin	20.8	0.38	15	516	23	34	9	Kap. 5.4.2–5.4.4
48	Var. Poten- tial	24.3	0.60		850				Abb. 50
46	@ -440 mV	23.3				6	11	0	Abb. 36 D
52	@ -340mV	24.1	0.28	14		13	34	2	Abb. 36 B, Abb. 52
53	@ -290 mV	24.3	0.45	12	121	25	32	7	Abb. 36 A, Abb. 54 A

56	@ -390 mV	26.9	0.08	8		8	13	0	Abb. 36 C, Abb. 54 B
----	--------------	------	------	---	--	---	----	---	-------------------------

Nr.	Anmer- kung	Tempe- ratur [°C]	Max. Strom- dichte [mA/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta\Gamma(n = 0)$ [Hz]	Pilieffizienz (15 kHz) [kHz/mA/cm <sup>2</sup> ]	Pilieffizienz (25 kHz) [kHz/mA/cm <sup>2</sup> ]	Pilieffizienz (35 kHz) [kHz/mA/cm <sup>2</sup> ]	
14_1	Std. An- satz	35	0.96	4888.083 3	5.158	4.823	4.749	Kap. 5.4.5
14_2	Std. An- satz	35	0.87	4876.666 7	8.275	8.586	9.399	Kap. 5.4.5
16	Std. An- satz	35	0.80	4773.833 3	3.286	3.034	2.903	Kap. 5.4.5
18_1	Std. An- satz	26	0.73	4980.833 3	5.664	5.279	4.946	Kap. 5.4.5, Abb. 57
18_2	Std. An- satz	26	0.78	5218.416 7	8.123	7.481	7.33	Kap. 5.4.5
28	Std. An- satz	21.2	0.44	3965.333 3	12.62	12.37	12.83	Kap. 5.4.5, Abb. 60
35	Std. An- satz	26.8	0.49	3456.666 7	15.49	16	16.8	Kap. 5.4.5
36	Std. An- satz	26.8	0.44	4824.666 7	15.51	14.38	14.31	Kap. 5.4.5
38	Acetat Verar- mung	28.6	0.40	5729	11153	10683	10579	Abb. 49
42_1	Std. An- satz	23.1	0.38	5344.916 7	14.72	14.79	15.33	Abb. 26, Kap. 5.4.5
42_2	Std. An- satz	23.1	0.65	4492.666 7	13.82	14.88	16.21	Kap. 5.4.5
23	Glycerin	23	0.45	5123.416 7	18.23	17.14	19.13	Kap. 5.4.5
25	Glycerin	21.4	0.27	5895.833 3	19.13	17.49	16.86	Abb. 33, Kap. 5.4.5
27	Glycerin	20.9	0.27	5467.583 3	17.09	15.46	13.61	Kap. 5.4.5

### 9.5 Liste der Veröffentlichungen und Präsentationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgende Publikationen veröffentlicht:

1. Sievers, P.; Moß, C.; Schröder, U.; Johannsmann, D.; Use of torsional resonators to monitor electroactive biofilms, *Biosensors and Bioelectronics*, **2018**, *110*, 225–232. DOI: 10.1016/j.bios.2018.03.046.
2. Sievers, P.; Johannsmann, D.; Environmental-Stress-Induced Increased Softness of Electroactive Biofilms, Determined with a Torsional Quartz Crystal Microbalance, *Analytical Chemistry*, **2019**, *91*, 14476–14481. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03204.

#### Vorträge und Posterpräsentationen

06/2019	Vortrag	Kolloquium Oberflächentechnik und -funktionalisierung	TU Clausthal
09/2018	Poster	EU-ISMET 2018	Newcastle University
07/2017	Vortrag	GDCh-Kolloquium	TU Clausthal
02/2017	Poster	Niedersächsisches Symposium Materialtechnik	TU Clausthal
11/2016	Poster	4. Workshop der Plattforminitiative Mikrobielle Bioelektrotechnologie	TU Braunschweig
09/2016	Poster	Summer School, Self-Assembly in Soft Matter and Biosystems	Bad Honnef
05/2016	Vortrag	Kolloquium Oberflächentechnik und -funktionalisierung	TU Clausthal